

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aplicação da proteômica e metabolômica no entendimento da interação
de *Austropuccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus*
grandis e *Syzygium jambos***

Bruno Augusto Prohmann Tschoeke

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2020**

Bruno Augusto Prohmann Tschoeke
Engenheiro Agrônomo

Aplicação da proteômica e metabolômica no entendimento da interação de
***Austropuccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus grandis* e**
Syzygium jambos

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE-VERDI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Tschoeke, Bruno Augusto Prohmann

Aplicação da proteômica e metabolômica no entendimento da interação de *Austropuccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus grandis* e *Syzygium jambos* / Bruno Augusto Prohmann Tschoeke. - - Piracicaba, 2020.

150 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *A. psidii* 2. *E. grandis* 3. *S. jambos* 4. Proteômica 5. Metabolômica 6. Interação patógeno-plantas I. Título

Aos meus amados pais, Almir José Tschoeke e Maria Goretti Prohmann, grandes responsáveis pela minha formação, que sempre estiveram comigo e me incentivaram a acreditaram em meu potencial em todos os momentos nesta árdua caminhada

Dedico

Aos meus queridos irmãos, Lucas Felipe e Isabelle Cristine, à minha noiva Mirian Santivañez pelo apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ser tão maravilhoso comigo em todos os setntidos, ainda mais em um ano tão difícil como esse.

Aos meus pais, Almir José Tschoeke e Maria Goretti Prohmann, meus grandes exemplos de vida.

Aos meus irmãos, Lucas Felipe e Isabelle Cristine, pelo apoio e companheirismo sempre.

À minha querida orientadora Profa. Maria Carolina Quecine-Verdi pelo apoio e disponibilidade e amizade de sempre, um grande exemplo de profissional e pessoa.

À minha família em geral por sempre acreditar em mim.

À minha noiva Mirian Angélica que me acompanhou desde o início desta caminhada, estando comigo em cada momento, junto nas dificuldades e conquistas.

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo pelas sábias palavras e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório Ariane, Bruna, Carolzinha, Everthon, Gustavo, Helena, Heloísa, Isabela, Isa, Jack, Jeroen, Jéssica, Joelma, Letícia, Lucas, Mari, Renata, Renatinha, Thiago e Zezo pelo apoio nos experimentos, companheirismo, conselhos e amizade.

Aos meus amigos desde a época da graduação Adijaílton, Arthur, Diogo, Pedro Andrade, Timóteo, Thiago Machado e Isaneli pela força, amizade e distração de sempre.

À Esalq-USP por contribuir fortemente por mais essa etapa da minha formação profissional.

Aos professores que contribuíram para melhorar minha formação em mais uma etapa da minha vida.

Ao Prof. Carlos Labate, Mônica, Thaís e todos integrantes do “Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas” pelo apoio nas análises e disponibilização de equipamentos.

À Prof. Luciana Duque Silva e aos técnicos Natanael e Sabino, responsáveis pelo Viveiro de mudas do Departamento de Ciências Florestais, pelo apoio na condução de mudas, ensinamentos e na atenção prestada sempre que necessário.

Ao Programa, secretaria e coordenação da Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pelo suporte e atenção em todos os momentos.

À Capes e à FAPESP pelo apoio financeiro, indispensável para a minha manutenção durante toda esta etapa da minha vida.

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a finalização desta tese.

Meu muito obrigado!

EPIGRAFE

*Ninguém é tão pequeno,
Que não tenha nada para dar.
E nem tão poderoso,
Que não tenha nada a receber.
Ninguém é tão fraco,
Que nunca tenha vencido.
Ninguém é tão forte,
Que nunca tenha chorado.
Ninguém é tão auto suficiente,
Para nunca ser ajudado.
Ninguém é tão inválido,
Que nunca tenha contribuído.
Ninguém é tão sábio,
Que nunca tenha errado.
Ninguém é tão corajoso,
Que nunca teve medo.
Ninguém é tão medroso,
Que nunca teve coragem.
Ninguém é tão alguém,
Que nunca precisou de ninguém.*

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	24
2. ANÁLISE PROTEÔMICA DE UREDINIÓSPOROS DE <i>Austropuccinia psidii</i> PROVENIENTES DE <i>Eucalyptus grandis</i> E <i>Syzygium jambos</i>	29
Resumo.....	29
Abstract	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	33
Material Biológico.....	33
Ensaio de germinação de urediniósporos MF-01 e GM-J1 <i>in vitro</i>	33
Extração de proteínas	34
Dessalinização das amostras	35
Quantificação de proteínas	35
Digestão das proteínas.....	36
Análise por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa (LC-MS / MS)	37
Análise de dados.....	37
Categorização funcional.....	38
Análise estatística.....	39
RESULTADOS.....	39
Germinação de urediniósporos de <i>A. psidii</i> provenientes de <i>E. grandis</i> (MF-01) e <i>S. jambos</i> (GM-J1).....	39
Proteômica de urenidiosporos de <i>A. psidii</i> provenientes de <i>E. grandis</i> (MF-01) e <i>S. jambos</i> (GM-J1).....	40
DISCUSSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	58

3. <i>Syzygium jambos</i> x <i>Austropuccinia psidii</i> : ESTUDO PROTEÔMICO VISANDO UM MELHOR ENTENDIMENTO DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO	63
Resumo	63
Abstract.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
METODOLOGIA.....	67
Material biológico.....	67
Inoculação de <i>A. psidii</i> GM-J1 em plantas de <i>S. jambos</i>	68
Monitoramento do patógeno por qPCR.....	68
Análise proteômica de <i>A. psidii</i> durante a infecção de <i>S. jambos</i>	69
Extração das proteínas.....	69
Dessalinização das amostras	70
Quantificação de proteínas	71
Digestão em gel SDS-PAGE.....	71
Purificação de peptídeos provenientes da digestão de amostra complexa	71
Separação dos peptídeos por cromatografia líquida 2D e obtenção dos espectros	72
Categorização funcional	73
Análise estatística	73
RESULTADOS	74
Monitoramento de <i>A. psidii</i> GM-J1 durante infecção de <i>S. jambos</i>	74
Proteínas de <i>A. psidii</i> (GM-J1) identificadas durante o processo de infecção em <i>S. jambos</i>	75
Estudo proteômico de plantas de <i>S. jambos</i> inoculadas com <i>A. psidii</i>	79
DISCUSSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	93
4. ESTUDOS ÔMICOS DA INTERAÇÃO <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Austropuccinia psidii</i> ...	97
Resumo	97
Abstract.....	98
INTRODUÇÃO.....	99
MATERIAL E MÉTODOS.....	101
Inoculação de <i>A. psidii</i> (MF-01) em plantas de <i>E. grandis</i>	101
Extração das proteínas	101
Dessalinização das amostras	102
Quantificação de proteínas	103
Digestão das amostras	103

Análise por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa (LC-MS / MS)	104
.....	104
Análise de dados.....	104
Análise estatística.....	105
Integração de dados proteômicos entre <i>E. grandis</i> e <i>A. psidii</i>	106
Extração de metabólitos	106
Separação e análise de metabólitos	107
Cromatografia Líquida (LC).....	107
Fragmentação e identificação de metabólitos (LC-MS).....	107
Cromatografia Gasosa (GC)	108
Processamento de dados brutos.....	108
Análise estatística dos dados obtidos por LC-MS e GC-MS	109
RESULTADOS.....	109
Proteínas de <i>A. psidii</i> identificadas durante o processo de infecção em <i>E. grandis</i>	109
Proteínas de <i>E. grandis</i> identificadas durante processo de infecção por <i>A. psidii</i>	116
Rede de correlação entre proteínas de <i>E. grandis</i> e <i>A. psidii</i>	125
Metabolômica.....	126
Análise de metabólitos totais de plantas de <i>E. grandis</i> inoculadas com <i>A. psidii</i> – LC-MS	126
.....	126
Análise de metabólitos totais de plantas de <i>E. grandis</i> inoculadas com <i>A. psidii</i> – GC-MS	135
.....	135
DISCUSSÃO	138
REFERÊNCIAS.....	145

RESUMO

Aplicação da proteômica e metabolômica no entendimento da interação de *Austropuccinia psidii* durante o processo de infecção de *Eucalyptus grandis* e *Syzygium jambos*

Os fungos causadores da doença conhecida como ferrugem são um dos grupos mais específicos de patógenos obrigatórios em plantas. *Austropuccinia psidii* (syn. *Puccinia psidii*, Sphaerophragmiaceae, Pucciniales) é um fungo Basidiomiceto que alcançou uma grande ocorrência de doença conhecida como ferrugem das Mirtáceas em diversas partes do mundo, causando doença em aproximadamente em 73 gêneros e 460 espécies de Myrtaceae. No Brasil, o patógeno foi inicialmente detectado infectando goiabeiras (*Psidium guajava*) e posteriormente foi detectado em eucalipto (*Eucalyptus grandis*). *Syzygium jambos* também é da família das Mirtáceas, e pode ser infectado com *A. psidii*. Infecções por *A. psidii* são frequentemente observadas a partir de urediniósporos assexuados, que podem percorrer grandes distâncias devido à ação do vento ou chuva. Sendo os urediniósporos, a primeira estrutura fúngica com um qual o hospedeiro tem contato, o seu perfil proteico é de suma importância para a melhor compreensão do arsenal molecular associado ao estágio inicial de infecção desse patógeno de acordo com os hospedeiros de origem. Diante disso, estudos ômicos se tornam importantes técnicas para aplicar durante o processo de infecção entre *A. psidii* - *E. grandis*, visando avaliar quais os compostos estão presentes nessa complexa interação planta-patógeno.

Capítulo 1: Inicialmente foi realizado um ensaio *in vitro* visando avaliar a germinação de urediniósporos de MF-01 e GM-J1, provenientes de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente, mediante estímulo do meio ágar-água e em meio ágar-água + 0,5% de óleo mineral. A partir do estudo *in vitro* foi possível observar que o estímulo óleo mineral (0,5%) apresentou melhores resultados quanto à germinação dos urediniósporos, chegando a 52,6% de germinação em MF-01 e 17,9% em GM-J1 respectivamente. Os urediniósporos MF-01 e GM-J1 também foram avaliados quanto ao perfil de proteínas visando o melhor entendimento do arsenal de proteínas inicial presentes nesta importante estrutura de infecção. Para tanto, a proteômica foi realizada por meio do espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplados a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY. Foi possível identificar 819 proteínas totais (incluindo comuns e exclusivas) a partir da análise de urediniósporos MF-01, sendo 74 que mais contribuíram para as diferenças de abundância; e, 798 proteínas totais (incluindo comuns e exclusivas) em urediniósporos GM-J1, sendo 65 que mais contribuíram para as diferenças de abundância. As proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas a partir da análise VIP pelo programa Metaboanalyst. Dentre as que mais contribuíram para as diferenças de abundância, as proteínas serina / treonina-proteína fosfatase, aspartato aminotransferase e sacaropina desidrogenase merecem destaque em urediniósporos de MF-01. Enquanto proteínas como proteínas difosfomevalonato descarboxilase, GMP sintase e adenilosuccinato sintetase foram classificadas como as que mais contribuíram para as diferenças de abundância e associadas à urediniósporos de GM-J1. Essas proteínas selecionadas são importantes nos processos iniciais de infecção do patógeno em plantas suscetíveis e pertencentes às rotas metabólicas importantes, podendo ser um indicativo para a produção de uma droga antifúngica, o combate ao patógeno em estágios iniciais da doença. **Capítulo 2:** Urediniósporos de GM-J1 foram inoculados em plantas suscetíveis de *S. jambos*, folhas foram coletadas às 0, 72, 144 e 336 horas após a inoculação, e a partir daí foi realizado o monitoramento, por qPCR, do patógeno na planta. Foi possível observar que às 336 h.a.i a quantidade (pg) de DNA de GM-J1 estava maior em relação aos outros tempos amostrados. A partir da análise realizada em espectrômetro de massas Q-Tof PREMIER acoplado a um instrumento RP-nano UPLC foi realizado um estudo proteômico durante o processo de infecção (0, 144 e 336 h.a.i) de GM-J1 em plantas suscetíveis de *S.*

jambos. Foi possível identificar 11 proteínas totais associadas à GM-J1, sendo 9 (0 h.a.i); 7 (144 h.a.i) e 6 (336 h.a.i). Destas, 3 (0 h.a.i); 3 (144 h.a.i) e 1 (336 h.a.i) foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância. Foi possível identificar também 118 proteínas totais associadas à *S. jambos*, sendo: 87 (0 h.a.i); 69 (144 h.a.i) e 63 (336 h.a.i). Destas, 36 (0 h.a.i); 11 (144 h.a.i) e 11 (336 h.a.i) foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância. As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância foram identificadas a partir da análise VIP. Como destaque em cada tempo avaliado, em relação à função da proteína associada a GM-J1, foi possível observar que a proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (0 h.a.i), pode ter um papel importante para a germinação de urediniosporos; *glycine dehydrogenase* e *heat shock protein SSB* (144 h.a.i), associados ao crescimento do micélio e patogenicidade; e *heat shock protein 60* (336 h.a.i), envolvida em ações relacionada à colonização, infecção e patogenicidade do fungo. Foram também identificadas proteínas importantes no processo de defesa da planta contra o ataque do patógeno: *photosystem II protein D2* e *photosystem I reaction center subunit III* (0 h.a.i); *pathogenesis-related protein STH-2-like* e *translationally-controlled tumor protein homolog* (144 h.a.i); *major allergen Pru ar 1* e *plastocyanin* (336 h.a.i). Estes resultados podem indicar que a partir das proteínas encontradas no estudo podemos ter um melhor entendimento acerca do que ocorre durante o processo de infecção, na interação *A. psidii* – *S. jambos*.

Capítulo 3: Foi realizado a análise metabolômica por meio de Cromatografia Líquida (LC-MS; nos modos negativo e positivo de operação) e Cromatografia Gasosa (GC-MS), aliados a uma análise proteômica realizada com o auxílio de espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplados a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY. Estas análises foram realizadas durante o início e final do processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis*, sendo coletado material vegetal inoculado com o patógeno às 0 e 144 horas após a inoculação (h.a.i.). Como resultados foram identificadas 2299 proteínas totais durante a interação planta patógeno. Onde 143 estão associadas a funções de *A. psidii* e 2156 relacionadas à *E. grandis*. Dentre as proteínas associadas à *A. psidii* destacam-se: *Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein* (0 h.a.i) – associada à formação de apressório; *transaldolase* (144 h.a.i) e *adenosylhomocysteinase* (144 h.a.i) – estas associadas ao metabolismo, patogenicidade e colonização no hospedeiro. Em relação as proteínas identificadas em *E. grandis*, as proteínas que possuem funções interessantes são: *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* e *rubisco accumulation factor 1* identificadas às 0 h.a.i (participando na produção de energia – fotossíntese); e as proteínas *malate dehydrogenase*, *major allergen Pru av 1-like*, *abscisic stress ripening protein*, *actin-7*, *V-type proton ATPase*, *proteasome subunit alpha* e *isoflavone reductase-like* identificadas às 144 h.a.i (com funções relacionada à defesa da planta). De acordo com os resultados obtidos a partir das análises metabolômicas foi possível observar que 59 metabólitos foram identificados a partir de LC-MS (50 no modo positivo de operação - 16 às 0 h.a.i e 34 às 144 h.a.i; e 9 no modo negativo de operação - 4 às 0 h.a.i e 5 às 144 h.a.i) e 32 a partir do estudo de GC-MS (com 7 às 0 h.a.i; 24 às 144 h.a.i e 1 presente em ambos os tempos analisados). A partir da análise LC-MS (modo positivo) a *oleacin* (0 h.a.i) pode estar auxiliando o processo de germinação do fungo. Enquanto a *ceramide* (144 h.a.i) atua no processo de defesa da planta. Na LC-MS (modo negativo de operação) os metabólitos *6-Hydroxy-3,3',4',5,7,8-hexamethoxyflavone* (0 h.a.i) e *Chlorhexidine* (144 h.a.i) foram encontrados e podem participar do mecanismo de defesa da planta. Como metabólitos importantes na interação patógeno-planta provenientes de GC-MS, o ácido cinâmico (encontrado as 0 h.a.i) pode auxiliar o fungo no processo de entrada nos tecidos da planta; e os metabólitos Calistegina A3, ácido azelaico, ácido glicérico e piridoxamina (encontrados às 144 h.a.i) estão associados ao processo de defesa da planta. Diversas proteínas e metabólitos identificados no presente estudo possuem funções relacionadas ao sistema de defesa da planta ou ao mecanismo de ataque desenvolvido pelo fungo. Há uma correlação entre as proteínas XP_010028896.1 (*eukaryotic peptide chain*

release factor subunit 1-3), XP_010056880.1 (*urease accessory protein G*), XP_010062321.1 (*expansin-A13*), XP_010066331.1 (*ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform X1*), XP_010044210.1 (*phosphoglucomutase cytoplasmic isoform X2*), XP_010038186.1 (*glutathione S-transferase F13*) identificadas em *E. grandis* com a proteína evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (*ADP-ribosylation factor*) encontrada no estudo proteômico em *A. psidii*. Neste sentido, os resultados obtidos contribuem com o melhor entendimento à nível molecular da interação entre *A. psidii* e *E. grandis*, servindo como base para futuros estudos. Desta forma, foi possível observar que estudos proteômicos e metabolômicos são de grande importância para um melhor entendimento da doença causada por *A. psidii* em plantas de *E. grandis* e *S. jambos*.

Palavras-chave: *A. psidii*, *E. grandis*, *S. jambos*, Proteômica, Metabolômica, Interação patógeno-planta

ABSTRACT

Application of proteomics and metabolomics studies to understand the interaction of *Austropuccinia psidii* during the infection process in *Eucalyptus grandis* and *Syzygium jambos*

The fungi that cause the disease known as rust are one of the most specific groups of pathogens required in plants. *Austropuccinia psidii* (syn. *Puccinia psidii*, Sphaerophragmiaceae, Pucciniales) is a Basidiomycete fungus that has reached a large occurrence of a disease known as Mirtacea rust in various parts of the world, causing disease in approximately 73 genera and 460 species of Myrtaceae. In Brazil, the pathogen was initially detected by infecting guava trees (*Psidium guajava*) and was later detected in eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Syzygium jambos* is also in the Mirtaceae family, and can be infected with *A. psidii*. *A. psidii* infections are often seen from asexual urediniospores, which can travel great distances due to the action of wind or rain. Since urediniospores are the first fungal structure with which the hospiteiro has contact, their protein profile is of paramount importance for a better understanding of the molecular arsenal associated with the initial stage of infection of this pathogen according to the host of origin. Therefore, omic studies become important techniques to apply during the infection process between *A. psidii* - *E. grandis*, aiming to evaluate which compounds are present in this complex plant-pathogen interaction. **Chapter 1:** Initially, an in vitro test was carried out to evaluate the germination of MF-01 and GM-J1 urediniospores, from *E. grandis* and *S. jambos* respectively, by stimulating the agar-water medium and agar-water medium + 0.5% mineral oil. From the in vitro study it was possible to observe that the mineral oil stimulus (0.5%) showed better results regarding the germination of the urediniospores, reaching 52.6% of germination in MF-01 and 17.9% in GM-J1 respectively. The urediniospores MF-01 and GM-J1 were also evaluated for protein profile in order to better understand the initial protein arsenal present in this important infection structure. For this purpose, proteomics was performed using the LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer coupled to an LC NLC instrument (MS-MS / MS) by an EASY system. It was possible to identify 819 total proteins (including common and exclusive) from the analysis of MF-01 urediniospores, 74 of which contributed most to differences in abundance; and, 798 total proteins (including common and exclusive) in urediniospores GM-J1, 65 of which contributed most to differences in abundance. Differentially abundant proteins were identified from the VIP analysis by the Metaboanalyst program. Among those that most contributed to the differences in abundance, the proteins serine / threonine-protein phosphatase, aspartate aminotransferase and sucropine dehydrogenase deserve to be highlighted in MF-01 urediniospores. While proteins such as diphosphomevalonate decarboxylase proteins, GMP synthase and adenyl succinate synthase were classified as those that most contributed to the differences in abundance and associated with GM-J1 urediniospores. These selected proteins are important in the initial pathogen infection processes in susceptible plants and belonging to important metabolic routes, and may be indicative for the production of an antifungal drug, the fight against the pathogen in the early stages of the disease. **Chapter 2:** GM-J1 urediniospores were inoculated into susceptible plants of *S. jambos*, leaves were collected at 0, 72, 144 and 336 hours after inoculation, and from there, the pathogen was monitored by qPCR in the plant. It was possible to observe that at 336 h.a.i the amount (pg) of GM-J1 DNA was greater in relation to the other sampled times. From the analysis performed on a Q-ToF PREMIER mass spectrometer coupled to an RP-nano UPLC instrument, a proteomic study was carried out during the infection process (0, 144 and 336 hai) of GM-J1 in susceptible plants of *S. jambos*. It was possible to identify 11 total proteins associated with GM-J1, 9 (0 h.a.i); 7 (144 h.a.i) and 6 (336 h.a.i). Of these, 3 (0 h.a.i); 3 (144 h.a.i) and 1 (336 h.a.i) were the ones that most contributed to the differences in abundance. It

was also possible to identify 118 total proteins associated with *S. jambos*, being: 87 (0 h.a.i); 69 (144 a.i.) and 63 (336 a.i.). Of these, 36 (0 h.a.i); 11 (144 h.a.i) and 11 (336 h.a.i) contributed the most to differences in abundance. The proteins that most contributed to the differences in abundance were identified from the VIP analysis. As a highlight in each evaluated time, in relation to the function of the protein associated with GM-J1, it was possible to observe that the protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (0 h.a.i), may have an important role for the germination of urediniospores; glycine dehydrogenase and heat shock protein SSB (144 h.a.i), associated with mycelial growth and pathogenesis; and heat shock protein 60 (336 h.a.i), involved in actions related to colonization, infection and pathogenicity of the fungus. Important proteins were also identified in the plant's defense process against pathogen attack: photosystem II protein D2 and photosystem I reaction center subunit III (0 h.a.i); pathogenesis-related protein STH-2-like and translationally-controlled tumor protein homolog (144 h.a.i); major allergen Pru ar 1 and plastocyanin (336 h.a.i). These results may indicate that based on the proteins found in the study, we can have a better understanding of what happens during the infection process. in the interaction *A. psidii* - *S. jambos*. **Chapter 3:** Metabolomic analysis was performed using Liquid Chromatography (LC-MS; in the negative and positive modes of operation) and Gas Chromatography (GC-MS), combined with a proteomic analysis performed with the aid of an LTQ Orbitrap mass spectrometer Velos coupled to an LC NLC instrument (MS-MS / MS) by an EASY system. These analyzes were performed during the beginning and end of the *A. psidii* infection process in *E. grandis*, and plant material inoculated with the pathogen was collected at 0 and 144 hours after inoculation (h.a.i.). As a result, 2299 total proteins were identified during the plant pathogen interaction. Where 143 are associated with functions of *A. psidii* and 2156 related to *E. grandis*. Among the proteins associated with *A. psidii*, the following stand out: Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein (0 h.a.i) - associated with the formation of appressorium; transaldolase (144 h.a.i) and adenosylhomocysteinase (144 h.a.i) - these associated with metabolism, pathogenicity and colonization in the host. Regarding the proteins identified in *E. grandis*, the proteins that have interesting functions are: ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase activase and rubisco accumulation factor 1 identified at 0 h.a.i (participating in the production of energy - photosynthesis); and malate dehydrogenase proteins, major allergen Pru av 1-like, abscisic stress ripening protein, actin-7, V-type proton ATPase, proteasome subunit alpha and isoflavone reductase-like identified at 144 hai (with functions related to plant defense). According to the results obtained from the metabolomic analyzes it was possible to observe that 59 metabolites were identified from LC-MS (50 in the positive mode of operation - 16 at 0 hai and 34 at 144 hai; and 9 in the negative mode of operation - 4 at 0 hai and 5 at 144 hai) and 32 from the study of GC-MS (with 7 at 0 hai; 24 at 144 hai and 1 present in both times analyzed). From the LC-MS analysis (positive mode), oleacin (0 h.a.i) may be helping the fungus germination process. While ceramide (144 h.a.i) acts in the plant defense process. In LC-MS (negative mode of operation) the metabolites 6-Hydroxy-3,3', 4', 5,7,8-hexamethoxyflavone (0 hai) and Chlorhexidine (144 hai) were found and may participate in the defense mechanism of the plant. As important metabolites in the pathogen-plant interaction from GC-MS, cinnamic acid (found at 0 h.a.i) can assist the fungus in the process of entering the plant tissues; and the metabolites Calistegina A3, azelaic acid, glycolic acid and pyridoxamine (found at 144 h.i.i) are associated with the plant's defense process. Several proteins and metabolites identified in the present study have functions related to the plant's defense system or the attack mechanism developed by the fungus. There is a correlation between proteins XP_010028896.1 (eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3), XP_010056880.1 (urease accessory protein G), XP_010062321.1 (expansin-A13), XP_010066331.1 (ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform X1), XP_010044210.1 (cytoplasmic phosphoglucomutase isoform X2), XP_010038186.1 (glutathione S-transferase F13) identified in *E. grandis* with the protein

evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (ADP-ribosyl factor) *A. psidii*. In this sense, the results obtained contribute to a better understanding at the molecular level of the interaction between *A. psidii* and *E. grandis*, serving as a basis for future studies. Thus, it was possible to observe that proteomic and metabolomic studies are of great importance for a better understanding of the disease caused by *A. psidii* in plants of *E. grandis* and *S. jambos*.

Keywords: *A. psidii*, *E. grandis*, *S. jambos*, Proteomics, Metabolomics, Pathogen-plant interaction

LISTA DE FIGURAS

2. Análise proteômica de urediniósporos de *Austropuccinia psidii* provenientes de *Eucalyptus grandis* e *Syzygium jambos*

- Figura 1.1.** Esquema do ciclo de vida de *Austropuccinia psidii*. Apenas o estágio 0 (espermagonial) ainda não foi descrito. Figura modificada de Glen et al., 2007.....31
- Figura 1.2.** Taxa de germinação de urediniósporos MF-01 e GM-J1 de *A. psidii* coletados de plantas de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente. O ensaio foi realizado in vitro e analisado 24 horas após inoculação. As barras representam o desvio padrão de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....40
- Figura 1.3.** Proteínas identificadas em urediniósporos de *A. psidii*. Foram encontradas 209 e 230 proteínas respectivamente em GM-J1 e MF-01 e 589 comuns a ambos isolados.....41
- Figura 1.4.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) demonstrando a separação das repetições dentro do mesmo grupo, relacionados às amostras coletadas de urediniósporos de *E. grandis* (MF-01) e de *S. jambos* (GM-J1). $R^2 = 0,99$; $Q^2 = 0,98$42
- Figura 1.5.** Dendograma gerado a partir de proteínas identificadas de urediniósporos MF-01 e GM-J1. O gráfico foi gerado no programa Metaboanalyst, podendo observar dois grupos representados por cada um dos isolados. O nível de similaridade entre os agrupamentos/repetições é medido com base na barra horizontal localizada abaixo do gráfico.....43
- Figura 1.6.** Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.....44
- Figura 1.7.** *Variable Importance in the Projection* (VIP) com $\text{score} \geq 1.5$ das 30 primeiras proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos de urediniósporos MF-01 e GM-J1. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Vermelho – maior abundância.....45

3. *Syzygium jambos* x *Austropuccinia psidii*: estudo proteômico visando um melhor entendimento da interação planta-patógeno

- Figura 2.1.** Quantificação de *Austropuccinia psidii* GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos*. Para analisar a quantidade (pg) de DNA de GM-J1 presente no tecido foliar infectado, a média de quatro repetições foram determinadas em cada ponto de tempo de amostragem; as barras verticais representam o desvio padrão; letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.....74
- Figura 2.2.** Proteínas identificadas de GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos*. Indicando o número de proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção estudados.....75

- Figura 2.3.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) mostrando a separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos* nos tempos: 0 horas, 144 horas e 336 horas após a inoculação. R2= 0,98; Q2= 0,94.....76
- Figura 2.4.** Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.....77
- Figura 2.5.** *Variable Importance in the Projection* (VIP) com score ≥ 1 das proteínas de *A. psidii* (GM-J1) que mais contribuíram para a separação dos grupos durante a infecção em *S. jambos* em todos os tempos analisados: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....78
- Figura 2.6.** Proteínas identificadas de *S. jambos* inoculados com *A. psidii* GM-J1 durante a interação planta-patógeno. Indicando o número de proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção estudados.....80
- Figura 2.7.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) mostrando a separação das repetições dentro do mesmo grupo, relacionados às amostras para análise de proteínas identificadas em *S. jambos* inoculadas com *A. psidii* nos tempos: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. R2= 0,97; Q2= 0,93.....81
- Figura 2.8.** Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.....82
- Figura 2.9.** *Variable Importance in the Projection* (VIP) com score ≥ 1 das proteínas de *S. jambos* que mais contribuíram para a separação dos grupos quando inoculados com o fungo *A. psidii* em todos os tempos analisados: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....83

4. Estudos ômicos da interação *Eucalyptus grandis* x *Austropuccinia psidii*

- Figura 3.1.** Proteínas identificadas de MF-01 inoculadas em *E. grandis*. As proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção. Tempos estudados: 0 h.a.i e 144 h.a.i.....110
- Figura 3.2.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA). A separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de *A. psidii* (MF-01) ocorreu durante o processo de infecção em *E. grandis* nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. R2= 0,99; Q2= 0,93.....111
- Figura 3.3.** *Variable Importance in the Projection* (VIP) com score ≥ 1 das proteínas referentes à *A. psidii* (MF-01) que mais contribuíram para a separação dos grupos entre 0 e 144 horas após a inoculação. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....112
- Figura 3.4.** Proteínas identificadas de *E. grandis* inoculadas com MF-01. As proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção. Tempos estudados: 0 h.a.i e 144 h.a.i.116

- Figura 3.5.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) mostrando a separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de *E. grandis* durante o processo de infecção por *A. psidii* (MF-01) nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. R2= 0,99; Q2= 0,99.....117
- Figura 3.6.** *Variable Importance in the Projection* (VIP) com score $\geq 1,5$ das proteínas identificadas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* (MF-01) que mais contribuíram para a separação dos grupos entre 0 h.a.i e 144 h.a.i. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....118
- Figura 3.7.** Rede de correlação entre proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância da interação planta-patógeno. A intensidade das cores indica se a correlação foi positiva ou negativa. Verde escuro (correlação negativa) e vermelho escuro (correlação positiva)125
- Figura 3.8.** Dados provenientes do estudo de LC-MS. Análise de componentes principais (PCA) do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – PCA das amostras no modo positivo de operação ESI+. B – PCA das amostras no modo negativo de operação ESI-.....126
- Figura 3.9.** Dados provenientes do estudo de LC-MS. Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – PLS-DA das amostras no modo positivo de operação ESI+. R2=0,99; Q2=0,96. B –PLS-DA das amostras no modo negativo de operação ESI-. R2=0,99; Q2=0,95.....127
- Figura 3.10.** Dados provenientes do estudo de LC-MS. Importância das variáveis nas projeções multivariadas (VIPs), com score $\geq 1,5$, do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – VIPs das amostras no modo positivo de operação ESI+. B – VIPs das amostras no modo negativo de operação ESI-. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....128
- Figura 3.11.** Classes de metabólitos identificados durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* provenientes da análise LC-MS no Modo Positivo de Operação. A – Classes de metabólitos presentes às 0 h.a.i. B – Classes de metabólitos presentes às 144 h.a.i.....129
- Figura 3.12.** Classes de metabólitos identificados durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* no Modo Positivo de Operação. A – Classes de metabólitos presentes às 0 h.a.i. B – Classes de metabólitos presentes às 144 h.a.i.....133
- Figura 3.13.** *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) proveniente de LC-MS. Separação das amostras entre grupos distintos, relacionados aos metabólitos totais identificados da interação *E. grandis* x *A. psidii* (MF-01) nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. R2= 0,99; Q2= 0,94.....135
- Figura 3.14.** Importância das variáveis nas projeções multivariadas (VIPs) com score $\geq 1,5$ provenientes do estudo de GC-MS do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.....136

LISTA DE TABELAS

2. Análise proteômica de urediniósporos de *Austropuccinia psidii* provenientes de *Eucalyptus grandis* e *Syzygium jambos*

Tabela 1.1. Proteínas totais que mais contribuíram para as diferenças de abundância (de acordo com a análise VIP) identificadas em urediniósporos de *A. psidii* MF-01 e GM-J1 provenientes de plantas de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente.....46

3. *Syzygium jambos* x *Austropuccinia psidii*: estudo proteômico visando um melhor entendimento da interação planta-patógeno

Tabela 2.1. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em urediniósporos de *A. psidii* coletados de *S. jambos*.....79

Tabela 2.2. Proteínas que mais contribuíram para a diferença de abundância durante o processo de infecção identificadas em plantas de *S. jambos* inoculadas com *A. psidii* entre zero e 336 horas após a inoculação.....84

4. Estudos ômicos da interação *Eucalyptus grandis* x *Austropuccinia psidii*

Tabela 3.1. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em plantas de *A. psidii* durante o processo de infecção em *E. grandis* entre zero e 144 horas após a inoculação.....113

Tabela 3.2. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em plantas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* entre zero e 144 horas após a inoculação.....120

Tabela 3.3. Metabólitos identificados, por Cromatografia Líquida (LC-MS), durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* durante 144 horas após a inoculação, no modo positivo de operação (ESI⁺)130

Tabela 3.4. Metabólitos identificados, por Cromatografia Líquida (LC-MS), durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* entre zero e 144 horas após a inoculação, no modo negativo de operação (ESI⁻)134

Tabela 3.5. Metabólitos identificados a partir da inoculação de *A. psidii* em plantas de *E. grandis* e analisados por GC-MS durante o processo de infecção (0 à 144 horas após a inoculação)137

1. INTRODUÇÃO

O agente causal da ferrugem das mirtáceas é o fungo *Austropuccinia psidii* (G. Winter) (sin *Puccinia psidii*), pertencente ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Sphaerophragmiaceae (Index Fungorum, 2020). Uma análise filogenética de máxima verossimilhança usando as sequências dos genes do RNA ribossômico nuclear sugeriu que *A. psidii* não pertence ao gênero *Puccinia*, mas, em vez disso, deveria estar dentro do novo gênero *Austropuccinia*, ordem Pucciniales e com a família redefinida para Sphaerophragmiaceae (Beenken et al., 2017).

A ferrugem das Mirtáceas, inicialmente descrita em folhas de *Psidium guajava* L. (*Psidium pomiferum* L.) (Myrtaceae) no Brasil (Winter, 1885), foi também descrita infectando diversas plantas do gênero *Eucalyptus* (Junghans et al., 2003; Machado et al., 2015) e atualmente é considerada uma das doenças mais preocupantes, pois está amplamente disseminada pelo Brasil e pelo mundo, causando sérios prejuízos em viveiros e plantios comerciais de eucalipto (Tommerup et al, 2003; Alfenas et al., 2004; Winzer et al., 2019). Isso se deve ao fato de que *A. psidii* é um patógeno invasor de importância mundial, que se expandiu rapidamente durante a última década causando muitos danos e perdas em diversos países: Austrália (Carnegie et al, 2016), Indonésia e Sudoeste da Ásia (McTaggart et al, 2016), África do Sul (Roux et al, 2016), Nova Zelândia e Singapura (Du Plessis et al., 2019).

Quecine et al. (2014) sugeriu que esse potencial de infectar uma variedade de plantas pode estar associado à sua alta variabilidade genética dentro das populações. Na América do Sul, a ferrugem é uma ameaça significativa ao *Eucalyptus grandis*, uma das espécies mais cultivadas. Além disso, está se tornando bastante importante para as Mirtáceas em seu centro de origem, a Austrália. Até o momento, 358 espécies nativas de 49 gêneros identificados na Austrália foram consideradas suscetíveis à ferrugem (Makinson, 2018). Este fungo infecta e mata as células das folhas e caules recém expandidos, bem como frutos e flores (Ferreira, 1983; Coutinho et al 1998; Carnegie et al., 2016).

Existem vários esforços para melhorar o conhecimento sobre a biologia de *A. psidii*, como a utilização do sequenciamento de seu genoma nuclear (Tan et al., 2014; Tobias et al., 2020); proteômica de urediniósporos (Quecine et al., 2016); efeitos das ceras cuticulares na germinação fúngica (Santos et al., 2019); confirmação de seu ciclo de vida sexual (McTaggart et al., 2018; McTaggart et al., 2020); entre outros.

A área total de árvores plantadas no Brasil totalizou 7,83 milhões de hectares em 2018, mantendo-se praticamente estável em relação ao ano de 2017. Os plantios de eucalipto ocupam

5,7 milhões de hectares desse total, ou seja 73% da área de árvores plantadas, enquanto as áreas com pinus somam 1,6 milhão de hectares, e outras espécies, entre elas seringueira, acácia, teca e paricá, representam cerca de 590 mil hectares (Instituto Brasileiro de Árvores – IBÁ, 2019).

O gênero *Eucalyptus*, que reúne mais de 600 diferentes espécies, é originário da Austrália e da Indonésia, e foi introduzido no Brasil em 1825 com fins ornamentais (Andrade, 1961). Devido a sua fácil adaptação, a espécie começou a ser cultivada no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul a partir de 1868, como matéria prima para a produção de lenha. A expansão a nível comercial ocorreu no início do século XX devido ao desenvolvimento da malha ferroviária (Pereira et al, 2000).

Atualmente, o eucalipto é considerado uma das principais fontes de matéria-prima para produzir papel. Em território brasileiro, o eucalipto encontrou ótimas condições de clima e solo para se desenvolver, com crescimento mais rápido que nos demais países, conferindo também um alto índice de produtividade (Associação Brasileira de Papel e Celulose – Bracelpa, 2019).

O eucalipto tem uso múltiplo. Além da produção de celulose, também é fonte de carvão vegetal para gerar energia e de madeira sólida usada em móveis, pisos, revestimentos e outras aplicações na construção civil. (Associação Brasileira de Papel e Celulose – Bracelpa, 2019).

O gênero *Syzygium* compreende aproximadamente 1.200 espécies que ocorrem em todo o mundo. *Syzygium* é um dos 131 gêneros pertencentes à família das Myrtaceae, que em sua totalidade possui em torno de 5500 espécies (Sobeh et al, 2018).

O jambo amarelo, *Syzygium jambos* (sin. *Eugenia jambos* L.), foi originalmente encontrado no Sudeste da Ásia, mas agora também está amplamente distribuído nos trópicos (Nawwar et al, 2016). Sabe-se que o jambo foi introduzido na Mata Atlântica brasileira, no entanto não foram encontrados registros sobre a época de introdução da planta no país. No entanto, é bastante sensato acreditar que a as primeiras introduções tenham ocorrido entre os séculos XVIII e início do século XIX (Carvalho, 2005).

O jambo é botanicamente classificado como um grande arbusto ou árvore de porte pequeno a médio. A planta é usada, tradicionalmente, no tratamento de hemorragias, sífilis, hanseníase, feridas, úlceras e doenças pulmonares devido às suas propriedades antipiréticas e anti-inflamatórias. Na Indochina, todas as partes das plantas (folhas, cascas e raízes) são empregadas para tratar distúrbios do trato digestivo e dos dentes. A decocção de folhas é usada como anti-reumático, diurético e também para aliviar as dores nos olhos (Kuiate et al., 2007; Nawwar et al, 2016).

Com a expansão da eucaliptocultura no Brasil nos últimos anos, propiciou também o aparecimento de várias doenças florestais, com destaque para a ferrugem das Mirtáceas,

também conhecida como ferrugem do eucalipto, que afeta principalmente as mudas em viveiro (Alfenas et al., 2009).

No jambo, o fungo *A. psidii* ataca indistintamente todos os tecidos novos das plantas em desenvolvimento. Em plantas adultas, inicialmente aparecem pequenas pontuações amareladas e necróticas, que evoluem para manchas circulares, necróticas, de coloração amarela, recobertas por uma densa e pulverulenta massa, de coloração amarela - viva, formada pelos urediniósporos e teliósporos do fungo. Com o tempo, essa massa amarela desaparece, permanecendo somente a área necrótica e seca, frequentemente apresentando rachaduras (Aime et al., 2017).

Devido a sua alta susceptibilidade, diversos estudos para o entendimento da ferrugem das Mirtáceas foram realizados em *S. jambos* (Tessmann et al., 2001; Uchida e Loope, 2009; Mohali; Aime, 2016 e McTaggart et al, 2018). Estas evidências tornam o *S. jambos* um promissor hospedeiro para o estudo de interação *A. psidii*-planta. Entretanto, em relação à questão econômica devido aos danos causados pelo patógeno, as perdas são observadas na eucaliptocultura em todo o mundo (Pegg et al., 2017; Dos Santos et al., 2020).

Diante de tantos prejuízos causados por microrganismos fitopatogênicos os dados gerados pelo sequenciamento dos genomas de diferentes organismos têm transformado a biologia voltado para o entendimento da interação planta-patógeno (Soanes et al., 2008; Spanu et al., 2010; Peng et al., 2020).

Recentemente as “ômicas” têm sido amplamente utilizadas nas várias áreas das ciências da vida como ferramentas úteis para identificar perfis moleculares, determinar novos biomarcadores, caracterizar sistemas bioquímicos complexos e esclarecer os processos fisiopatológicos em várias doenças causadas por fungos biotróficos (Jonkers et al., 2012; Duplessis; Bakkeren; Hamelin, 2014; Peršoh, 2015; Bindschedler; Panstruga; Spanu, 2016). Dentre as ômicas, há diversos estudos relacionados à genômica e a transcriptômica da interação planta-patógeno. Em resumo, a genômica é o estudo de todo o genoma de um organismo ou um conjunto de espécies. Já a transcriptômica é a quantificação do transcriptoma, o conjunto completo de transcritos em uma célula e sua abundância, para um estágio específico de desenvolvimento ou condição fisiológica (Wang; Gerstein; Snyder, 2009). A partir desse estudo existe a possibilidade de identificar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão gênica ao comparar várias populações de mRNA e vem tendo um impacto significativo em quase todos os ramos das ciências biológicas, em especial no caso do estudo da interação planta-patógeno (Balmer; Glauser; Mauch-Mani, 2013; Castro-Moretti et al., 2020).

Não menos importante, mas mais incipiente devido a diversos desafios metodológicos são os estudos relacionados à proteômica e metabolômica da interação planta-patógeno. Foi

somente mediante a integração das várias áreas do conhecimento com a genômica, dos processos de transcrição das informações contidas nos genes, com a transcriptômica, que houve a expansão bem como a compreensão do conjunto dos produtos destes genes pela proteômica e recentemente pela metabolômica (Espíndola et al., 2010).

A proteoma foi definido por Wilkins et al. (1996), como a análise da expressão gênica baseada em proteínas, onde o proteoma representa todas as proteínas expressas por um genoma de uma célula ou de um tipo de tecido. A proteômica permite a análise qualitativa e quantitativa de um grande número de proteínas em diferentes situações fisiológicas, revelando com isso um padrão da expressão proteica sobre vários momentos da célula, o que reflete em diferentes momentos metabólicos (Liebold; Graack. 2006; Barros et al. 2010). Os métodos de análises de proteômica são diversos: sistemas híbrido-levedura, gel 2D, espectrometria de massas, entre outros (Quirino et al. 2010).

Dentre as técnicas citadas acima a espectrometria de massa, é uma das técnicas analíticas mais poderosa, que pode ser utilizada na identificação de proteínas desconhecidas, sendo possível a detecção das mesmas em concentrações muito baixas em misturas quimicamente complexas, permitindo não apenas a detecção e determinação das estruturas destas moléculas através de experimentos de fragmentação, mas também a sua quantificação. A combinação da sensibilidade, especificidade, seletividade e rapidez fazem da espectrometria de massas uma técnica ideal para a análise de biomoléculas, com destaque a proteínas (Baldwin, 1995; Hopfgartner; Varesio, 2012). Com todas essas vantagens no uso da espectrometria de massas, estudos de proteoma de fungos filamentosos são recentes, apesar da importância desses organismos na indústria biotecnológica, como patógenos humanos e, principalmente, como causadores de doenças em plantas (Abbai et al, 2016; Li et al, 2017; Kallamadi et al, 2018).

Destaca-se que a metabolômica é frequentemente vista como uma técnica complementar em relação às outras técnicas de genômica funcional (transcriptômica e proteômica). No entanto, também oferece vantagens distintas ao tentar entender um patógeno ou um processo de interação entre organismos (Allwood; Ellis; Goodacre, 2008; Parker et al., 2009). Estes estudos aliados, têm se tornado uma grande maneira de melhorar o entendimento de processos biológicos até então desconhecidos (Lyu et al., 2015; Felix et al., 2019). Como um estudo complementar, mediante a necessidade de se estudar e buscar respostas a nível molecular em relação ao que ocorre na interação planta-patógeno, a metabolômica surgiu e vem sendo cada vez mais utilizada no campo das ciências biológicas (Tenenboim; Brotman, 2016; Chen; Ma; Chen, 2019; Lykogianni et al., 2020). Com essa tecnologia é possível realizar a caracterização de uma alta quantidade de metabólitos, onde pequenos compostos moleculares (<1500 Da), que

constituem os produtos finais do metabolismo celular, fornecem uma impressão digital de um organismo baseado nas substâncias químicas presentes em um momento específico (Cambiaghi; ferrario; Masseroli, 2017). Mais precisamente, estudos metabolômicos envolvem a identificação e quantificação de metabólitos, com o objetivo de correlacionar mudanças no metabolismo de um organismo em resposta à presença de outro (Mehrotra; Mendes, 2006).

A biossíntese de metabólitos secundários é um dos fatores mais significativos e bem estudados (Bennett; Wallsgrove, 1994), tendo vários trabalhos descritos na literatura no estudo de doenças de plantas (Vinale et al, 2008; Mazid et al, 2011; Schmidt et al, 2012; Mookherjee et al., 2020). Esses metabólitos são fitoquímicos que não estão diretamente envolvidos nos mecanismos básicos como crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas são necessários na rede ecológica das plantas (Dixon, 2001).

A LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas) e a GC-MS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas) vêm sendo cada vez mais aplicadas nos estudos envolvendo análises metabolômicas na interação planta-patógeno (López-Gresa et al, 2010; Tata et al, 2015; Warth et al, 2015; Mishra et al, 2017). A Cromatografia Líquida (LC) é uma técnica analítica de fácil operação, que apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade (Xiayan; Legido-Quigley, 2008), sendo considerada uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, devido a grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa (fundamentalmente partição), com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica (Zhou et al., 2012). As vantagens da análise de GC-MS incluem alta eficiência de separação e boa reprodutibilidade, mas muitos compostos contendo grupos polares requerem derivatização em pré-coluna para alcançar uma boa separação (Kuhara et al., 2011). A maior vantagem do GC-MS é que este método pode usar bibliotecas para identificação estrutural e um grande número de bibliotecas podem ser recuperadas (Halket et al., 2005).

Para elucidar a interação entre fungos biotróficos e plantas, alguns estudos baseados em metabolômica foram publicados (Ali et al, 2013; Zhang; Becker et al, 2015; Do Nascimento et al, 2019). No entanto é necessário realizar cada vez mais estudos relacionados à interação planta-patógeno, a partir de análises proteômicas e metabolômicas, para obter mais respostas e entender o processo como um todo.

Visando colaborar com a melhor compreensão da complexa interação entre *A. psdii* (MF-01; GM-J1) e seus dois principais e mais bem estudados hospedeiros *E. grandis* e *S. jambos*, o presente estudo levantou as seguintes hipóteses:

Capítulo 1 –Mesmo ocorrendo a infecção cruzada, urediniósporos de *A. psidii* (MF-01) provenientes de diferentes hospedeiros possuem um arsenal proteico específico, fruto da modulação da interação patógeno-hospedeiro;

Capítulo 2 – *Syzygium jambos* possuem alta suscetibilidade à *A. psidii* (GM-J1) o que reflete na alta infecção do hospedeiro bem como alterações do perfil proteico do patógeno e do hospedeiro durante o processo de infecção;

Capítulo 3- O perfil metabólico e proteico de *E. grandis* é alterado mediante infecção por *Austropuccinia psidii* (MF-01).

REFERÊNCIAS

- ABBAI, Ragavendran et al. Proteomic analysis of compatible and incompatible interactions of wheat with *Puccinia triticina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 96, p. 36-46, 2016.
- AIME, M. Catherine et al. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. In: **Advances in genetics**. Academic Press, 2017. p. 267-307.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**, 1ª ed., Viçosa, MG: UFV, 500 p. 2004.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**, 2ª ed., Viçosa, MG: UFV, 500 p. 2009.
- ALI, Mohammad et al. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400-406, 2013.
- ALLWOOD, J. William; ELLIS, David I.; GOODACRE, Royston. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia plantarum**, v. 132, n. 2, p. 117-135, 2008.
- ANDRADE, E. D. N. O eucalipto. Companhia Paulista de Estrada de Ferro, São Paulo.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PAPEL E CELULOSE - BRACELPA. Disponível em: <http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/136> . Acesso em: 09 mar. 2020.
- BALDWIN, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. **Natural Product Reports**, v. 12, n. 1, p. 33-44, 1995.
- BALMER, Dirk et al. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 82, 2013.
- BARROS, Bruno HR et al. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal biology**, v. 114, n. 7, p. 572-579, 2010.
- BEENKEN, Ludwig et al. *Austropuccinia*: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). **Phytotaxa**, v. 297, n. 1, p. 53-61, 2017.
- BENNETT, Richard N.; WALLSGROVE, Roger M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BINDSCHEDLER, Laurence V.; PANSTRUGA, Ralph; SPANU, Pietro D. Mildew-omics: how global analyses aid the understanding of life and evolution of powdery mildews. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 123, 2016.
- CAMBIAGHI, Alice; FERRARIO, Manuela; MASSEROLI, Marco. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Briefings in bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 498-510, 2017.
- CARNEGIE, Angus J. et al. Impact of the invasive rust *Puccinia psidii* (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia. **Biological Invasions**, v. 18, n. 1, p. 127-144, 2016.
- CARVALHO, F. A. *Syzygium jambos* (L.) Alston–uma invasora na Mata Atlântica. **Simpósio Brasileiro de espécies exóticas e invasoras**, p. 13, 2005.
- CASTRO-MORETTI, Fernanda R. et al. Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant–Pathogen Interactions. **Metabolites**, v. 10, n. 2, p. 52, 2020.
- CHEN, Fangfang; MA, Ruijing; CHEN, Xiao-Lin. Advances of Metabolomics in Fungal Pathogen–Plant Interactions. **Metabolites**, v. 9, n. 8, p. 169, 2019.

- COUTINHO, T. A. et al. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.
- DIXON, Richard A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001.
- DO NASCIMENTO, Ticiano Gomes et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.
- DOS SANTOS, Alex Passos et al. Quantifying losses in productivity by the rust in eucalypt plantations in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 468, p. 118170, 2020.
- DU PLESSIS, Sébastien; BAKKEREN, Guus; HAMELIN, Richard. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2014. p. 173-209.
- ESPINDOLA, Foued Salmen et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.
- FELIX, Carina et al. A multi-omics analysis of the grapevine pathogen *Lasiodiplodia theobromae* reveals that temperature affects the expression of virulence-and pathogenicity-related genes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 7, n. 2, p. 91-109, 1983.
- HALKET, John M. et al. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 410, p. 219-243, 2005.
- HOPFGARTNER, Gérard; VARESIO, Emmanuel. The life sciences mass spectrometry research unit. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 335-338, 2012.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=213865>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. Disponível em: http://iba.org/images/shared/iba_2019.pdf. Acesso em: 09 mar. 2020.
- JONKERS, Wilfried et al. Metabolome and transcriptome of the interaction between *Ustilago maydis* and *Fusarium verticillioides* in vitro. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 10, p. 3656-3667, 2012.
- JUNGHANS, D. T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 1, p. 175-180, 2003.
- KALLAMADI, Prathap Reddy et al. An Insight into Powdery Mildew-Infected, Susceptible, Resistant, and Immune Sunflower Genotypes. **Proteomics**, v. 18, n. 16, p. 1700418, 2018.
- KUHARA, Tomiko et al. A GC/MS-based metabolomic approach for diagnosing citrin deficiency. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 7, p. 1881-1894, 2011.
- KUIATE, Jules-Roger et al. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 2, p. 149-152, 2007.
- LI, Jie et al. Proteomic analysis of the compatible interaction of wheat and powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. tritici). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 234-243, 2017.
- LIEBOLD, B. Wittmann; GRAACK, H. Rüdiger; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomic studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4688-4703, 2006.
- LÓPEZ-GRESA, M. Pilar et al. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 21, n. 1, p. 89-94, 2010.
- LYKOGIANNI, Maira et al. Metabolomics reveals differential mechanisms of toxicity of hyperbranched poly(ethyleneimine)-derived nanoparticles to the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2020.
- LYU, Xueliang et al. Comparative genomic and transcriptional analyses of the carbohydrate-active enzymes and secretomes of phytopathogenic fungi reveal their significant roles during infection and development. **Scientific reports**, v. 5, p. 15565, 2015.
- MACHADO, Patrícia da S. et al. Epitypification of *Puccinia psidii*, causal agent of guava rust. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 5-12, 2015.
- MAKINSON RO. Myrtle Rust reviewed: The impacts of the invasive plant pathogen *Austropuccinia psidii* on the Australian environment. **Plant Biosecurity Cooperative Research Centre**, Canberra. 2018 [Citado 13 de Novembro de 2020]. Available from: <http://www.apbsf.org.au/wp-content/uploads/2018/11/Myrtle-Rust-reviewed-June-22-2018-web.pdf>.
- MAZID, Mohd et al. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 167-184, 2011.
- MCTAGGART, Alistair R. et al. Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in South-East Asia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 83-89, 2016.

- MCTAGGART, A. R. et al. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. **Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 729-734, 2018.
- MCTAGGART, Alistair R. et al. Sexual reproduction in populations of *Austropuccinia psidii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 537-545, 2020.
- MEHROTRA, B.; MENDES, P. Bioinformatics approaches to integrate metabolomics and other systems biology data. In: **Plant metabolomics**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 105-115.
- MISHRA, Vineet Kumar et al. Determination and production of antimicrobial compounds by *Aspergillus clavatonanicus* strain MJ31, an endophytic fungus from *Mirabilis jalapa* L. using UPLC-ESI-MS/MS and TD-GC-MS analysis. **PLoS one**, v. 12, n. 10, p. e0186234, 2017.
- MOHALI, S. R.; AIME, M. C. First report of *Puccinia psidii* (myrtle rust) on *Syzygium jambos* in Venezuela. **New Disease Reports**, v. 34, p. 18-18, 2016.
- MOOKHERJEE, Abhirup et al. Characterization of endo-metabolome exhibiting antimicrobial and antioxidant activities from endophytic fungus *Cercospora* sp. PM018. **South African Journal of Botany**, 2020.
- NAWWAR, Mahmoud A. et al. Phenolic profiling of an extract from *Eugenia jambos* L. (Alston)-the structure of three flavonoid glycosides—antioxidant and cytotoxic activities. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 3, p. 162-168, 2016.
- PARKER, David et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Journal**, v. 59, n. 5, p. 723-737, 2009.
- PEGG, Geoff et al. Impact of *Austropuccinia psidii* (myrtle rust) on Myrtaceae-rich wet sclerophyll forests in south east Queensland. **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0188058, 2017.
- PENG, Jingyu et al. Draft genome sequence resource for *Blumeriella jaapii*, the cherry leaf spot pathogen. **Phytopathology**, n. ja, 2020.
- PEREIRA, José Carlos Duarte et al. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. **Embrapa Florestas-Docmentos (INFOTECA-E)**. 2000.
- PERŠOH, Derek. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. **Fungal Diversity**, v. 75, n. 1, p. 1-25, 2015.
- QUECINE, Maria Carolina et al. Genetic variability in *Puccinia psidii* populations as revealed by PCR-DGGE and T-RFLP markers. **Plant disease**, v. 98, n. 1, p. 16-23, 2014.
- QUECINE, Maria Carolina et al. Label-free quantitative proteomic analysis of *Puccinia psidii* uredospores reveals differences of fungal populations infecting eucalyptus and guava. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. e0145343, 2016.
- QUIRINO, B. F. et al. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 351-362, 2010.
- ROUX, Jolanda et al. A unique genotype of the rust pathogen, *Puccinia psidii*, on Myrtaceae in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 645-652, 2016.
- SANTOS, Isaneli Batista dos et al. The *Eucalyptus* cuticular waxes contribute in preformed defense against *Austropuccinia psidii*. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1978, 2019.
- SCHMIDT, T. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012.
- SOANES, Darren M. et al. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. **PLoS One**, v. 3, n. 6, 2008.
- SOBEH, Mansour et al. Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 223-231, 2018.
- SPANU, Pietro D. et al. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. **Science**, v. 330, n. 6010, p. 1543-1546, 2010.
- TAN, Mui-Keng et al. A brief overview of the size and composition of the myrtle rust genome and its taxonomic status. **Mycology**, v. 5, n. 2, p. 52-63, 2014.
- TATA, Alessandra et al. Evaluation of imprint DESI-MS substrates for the analysis of fungal metabolites. **RSC advances**, v. 5, n. 92, p. 75458-75464, 2015.
- TENENBOIM, Hezi; BROTMAN, Yariv. Omic relief for the biotically stressed: metabolomics of plant biotic interactions. **Trends in plant science**, v. 21, n. 9, p. 781-791, 2016.
- TESSMANN, D. J. et al. Epidemiology of a Neotropical rust (*Puccinia psidii*): periodical analysis of the temporal progress in a perennial host (*Syzygium jambos*). **Plant Pathology**, v. 50, n. 6, p. 725-731, 2001.
- TOBIAS, Peri A. et al. *Austropuccinia psidii*, causing myrtle rust, has a gigabase-sized genome shaped by transposable elements. **bioRxiv**, 2020.
- TOMMERUP, I. C. et al. Guava rust in Brazil—a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 33, n. 3, p. 420-428, 2003.
- UCHIDA, J. Y.; LOOPE, L. L. A recurrent epiphytotic of guava rust on rose apple, *Syzygium jambos*, in Hawaii. **Plant Disease**, v. 93, n. 4, p. 429-429, 2009.
- VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008.

- WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.
- WARTH, Benedikt et al. GC-MS based targeted metabolic profiling identifies changes in the wheat metabolome following deoxynivalenol treatment. **Metabolomics**, v. 11, n. 3, p. 722-738, 2015.
- WILKINS, Marc R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996.
- WINTER, G. Repertorium. Rabenhorstii Fungi Europaei et Extraeuropaei cura Dr. G. Winter. Centuria XXXIII et XXXIV. 1885.
- WINZER, Laura Fernandez et al. *Austropuccinia psidii* on the move: survey-based insights to its geographical distribution, host species, impacts and management in Australia. **Biological Invasions**, v. 21, n. 4, p. 1215-1225, 2019.
- XIAYAN, Li; LEGIDO-QUIGLEY, Cristina. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724-3736, 2008.
- ZHANG, Lu; BECKER, Donald. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 552, 2015.
- ZHOU, Bin et al. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 2, p. 470-481, 2012.

2. ANÁLISE PROTEÔMICA DE UREDINIÓSPOROS DE *Austropuccinia psidii* PROVENIENTES DE *Eucalyptus grandis* E *Syzygium jambos*

Resumo

Os fungos causadores da doença conhecida como ferrugem são um dos grupos mais específicos de patógenos obrigatórios em plantas. *Austropuccinia psidii* (syn. *Puccinia psidii*, Sphaerophragmiaceae, Pucciniales) é um fungo Basidiomiceto que alcançou uma grande ocorrência de doença conhecida como ferrugem das Mirtáceas em partes do mundo, doença em aproximadamente 73 gêneros e 460 espécies de Myrtaceae. Entre os hospedeiros da doença, incluem as espécies *Eucalyptus grandis* importante para a indústria florestal e *Syzygium jambos*, com grande função biológica no entendimento do ciclo da doença devido a sua alta susceptibilidade ao patógeno. Infecções por *A. psidii* são frequentemente observadas a partir de urediniósporos assexuados, que podem percorrer grandes distâncias devido à ação do vento ou chuva. Sendo os urediniósporos, a primeira estrutura fúngica com um qual o hospedeiro tem contato, o seu perfil proteico é de suma importância para a melhor compreensão do arsenal molecular associado ao estágio inicial de infecção desse patógeno de acordo com os hospedeiros de origem. Inicialmente foi realizado um ensaio *in vitro* visando avaliar a germinação de urediniósporos de MF-01 e GM-J1, provenientes de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente, mediante estímulo do meio ágar-água e em meio ágar-água + 0,5% de óleo mineral. A partir do estudo *in vitro* foi possível observar que o estímulo óleo mineral (0,5%) apresentou melhores resultados quanto à germinação dos urediniósporos, chegando a 52,6% de germinação em MF-01 e 17,9% em GM-J1 respectivamente. Os urediniósporos MF-01 e GM-J1 também foram avaliados quanto ao perfil de proteínas visando o melhor entendimento do arsenal de proteínas inicial presentes nesta importante estrutura de infecção. Para tanto, a proteômica foi realizada por meio do espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplados a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY. Foi possível identificar 819 proteínas totais (incluindo comuns e exclusivas) a partir da análise de urediniósporos MF-01, sendo 74 que mais contribuíram para as diferenças de abundância; e, 798 proteínas totais (incluindo comuns e exclusivas) em urediniósporos GM-J1, sendo 65 que mais contribuíram para as diferenças de abundância. As proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas a partir da análise VIP pelo programa Metaboanalyst. Dentre as que mais contribuíram para as diferenças de abundância, as proteínas serina / treonina-proteína fosfatase, aspartato aminotransferase e sacaropina desidrogenase merecem destaque em urediniósporos de MF-01. Enquanto proteínas como proteínas difosfomevalonato descarboxilase, GMP sintase e adenilosuccinato sintetase foram classificadas como as que mais contribuíram para as diferenças de abundância e associadas à urediniósporos de GM-J1. Essas proteínas selecionadas são importantes nos processos iniciais de infecção do patógeno em plantas suscetíveis e pertencentes às rotas metabólicas importantes, podendo ser um indicativo para a produção de uma droga antifúngica, o combate ao patógeno em estágios iniciais da doença.

Palavras-chave: proteômica; ferrugem das Mirtáceas; urediniósporos; processo de infecção.

Proteomic analysis of urediniospores of *Austropuccinia psidii* from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium jambos*

Abstract

The fungi that cause the disease known as rust are one of the most specific groups of pathogens required in plants. *Austropuccinia psidii* (syn. *Puccinia psidii*, Sphaerophragmiaceae, Pucciniales) is a Basidiomycete fungus that has reached a large occurrence of a disease known as Mirtacea rust in parts of the world, a disease in approximately 460 in several types of 73 genera of Myrtaceae. Among the hosts of the disease, include the species *Eucalyptus grandis* important for the forestry industry and *Syzygium jambos*, with great biological function in understanding the disease cycle due to their high susceptibility to the pathogen. *A. psidii* infections are often seen from asexual urediniospores, which can travel great distances due to the action of wind or rain. Since urediniospores are the first fungal structure with which the hospedeiro has contact, their protein profile is of paramount importance for a better understanding of the molecular arsenal associated with the initial stage of infection of this pathogen according to the host of origin. Initially, an *in vitro* test was carried out to evaluate the germination of MF-01 and GM-J1 urediniospores, from *E. grandis* and *S. jambos*, respectively, by stimulating the agar-water medium and agar-water medium + 0.5 % of mineral oil. From the *in vitro* study it was possible to observe that the mineral oil stimulus (0.5%) showed better results regarding the germination of the urediniospores,

reaching 52.6% of germination in MF-01 and 17.9% in GM-J1 respectively. The urediniospores MF-01 and GM-J1 were also evaluated for protein profile in order to better understand the initial protein arsenal present in this important infection structure. For this purpose, proteomics was performed using the LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer coupled to an LC NLC instrument (MS-MS / MS) by an EASY system. It was possible to identify 819 total proteins (including common and exclusive) from the analysis of MF-01 urediniospores, 74 of which are differentially abundant; and, 798 total proteins (including common and exclusive proteins) in GM-J1 urediniospores, 65 of which are differentially abundant. Differentially abundant proteins were identified from the VIP analysis by the Metaboanalyst program. Among the differentially abundant proteins, serine / threonine-protein phosphatase, aspartate aminotransferase and sucropine dehydrogenase deserve to be highlighted in MF-01 urediniospores. While proteins such as diphosphomevalonate decarboxylase proteins, GMP synthase and adenyl succinate synthase have been classed as differential abundantly and associated with GM-J1 urediniospores. These selected proteins are important in the initial pathogen infection processes in susceptible plants and belonging to important metabolic routes, and may be indicative for the production of an antifungal drug, the fight against the pathogen in the early stages of the disease.

Keywords: proteomics; myrtle rust; urediniospores; infection process.

INTRODUÇÃO

Os fungos causadores de ferrugem (Basidiomycota, Pucciniales) são um grupo diversificado e incomum de patógenos vegetais, pois são capazes de infectar uma grande gama de gêneros e espécies de plantas hospedeiras (Morin et al., 2012). Assim, os mesmos são classificados como um dos grupos mais importantes em termos econômicos de patógenos de plantas cultivadas (Cummins; Hiratsuka, 2003; Aime et al., 2006). Esses patógenos são parasitas caracterizados como biotróficos obrigatórios, capazes de absorver nutrientes das células do hospedeiro sem, no entanto, causar a morte da planta hospedeira (Cummins; Hiratsuka, 2003).

Os fungos causadores de ferrugem são patógenos específicos do hospedeiro que possuem um ciclo de vida extremamente complexo. Uma única espécie pode necessitar de duas plantas hospedeiras não relacionadas para completar seu ciclo de vida; outras ferrugens possuem ciclos de vida menos complexos, onde um ou mais dos estágios de produção de esporos sexuais pode estar ausente (Aime et al., 2017). Em ambos os casos, os esporos produzidos por esses patógenos são as estruturas principais de infecção do hospedeiro.

Destaca-se como relevante ferrugem presente no Brasil a *Austropuccinia psidii* (conhecido também como *Puccinia psidii*), agente causal da ferrugem das Mirtáceas. *A. psidii* é um fungo Basidiomiceto da ordem Pucciniales primeiramente descrito por Winter (1885), em goiaba (*Psidium guava*) no Brasil. Recentemente seu gênero foi reclassificado na família Sphaerophragmiaceae por Beenken (2017) de acordo com análises morfológicas e filogenéticas.

Os estágios do ciclo de vida de *A. psidii* incluem urediniósporos, um estágio de esporo clonal dicariótico, e teliósporos diplóides que produzem basidiósporos a partir de meiose. Basidiósporos maduros possuem dois núcleos, mas ainda não se sabe se estes são hetero ou homocarióticos (Morin et al. 2014; McTaggart et al. 2018). Havia sido descritos dois diferentes ciclos de vida de *A. psidii*. Coutinho et al. (1998) sugeriu que a conclusão do ciclo de vida de *A. psidii* ocorre em um único hospedeiro, sem que haja a presença do estágio espermogonial e formação de aeciósporos. Já Ruiz et al. (1989) e Simpson et al. (2006) relataram que os estágios espermogonial e aecial podem estar presentes em hospedeiros alternativos, porém até então, desconhecidos. No entanto atualmente é aceito que a única fase ainda desconhecida sobre o ciclo de *A. psidii* é a fase espermogonial, o estágio I (aécio) (Figura 1.1) foi observado por Figueiredo (2001 apud Glen et al., 2007), observando que os aeciósporos são indistinguíveis morfológicamente dos urediniósporos.

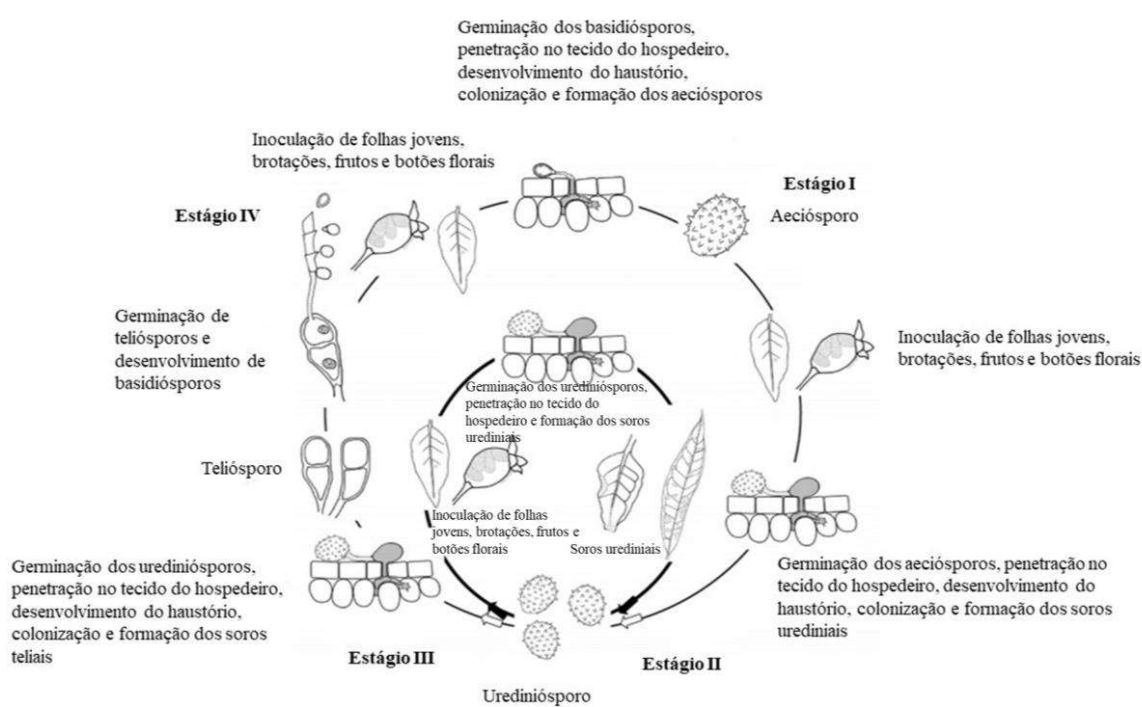


Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida de *Austropuccinia psidii*. Apenas o estágio 0 (espermogonial) ainda não foi descrito. Figura modificada de Glen et al., 2007.

Em vários fungos fitopatogênicos, incluindo *A. psidii* (Sedlarová et al., 2016; Pétriacq; Stassem; Ton, 2016) os esporos são encontrados em grandes quantidades no meio ambiente e são essenciais para a dispersão e sobrevivência de muitas espécies (Moore-Landecker, 2011; Kochkina et al., 2012). Os esporos de maneira geral podem suportar temperaturas severas (Pinto et al., 2020), dessecação e altos níveis de radiação e exposição a radicais (Holloman;

Schirawski; Holliday, 2007) dentre outras condições fatais para muitas outras formas de vida. As condições ideais para a germinação podem incluir, entre outros, a introdução de nutrientes, a presença de luz, a modulação da temperatura, as mudanças na osmolaridade, as mudanças de pH, a remoção de fatores de dormência e a introdução de moléculas de sinalização extracelular (Alavi et al., 2013; Turgeman et al., 2016; Van Long et al., 2017).

Após a germinação dos seus esporos, os fungos fitopatogênicos conseguem atingir o interior da planta por pressão mecânica a partir do apressório, além de utilizar oxidases, esterases, cutinases, lipases e enzimas que degradam a parede celular, a tornando menos rígida e facilitando a entrada do fungo (Bellincampi; Cervone; Lionetti et al., 2014). No caso de *A. psidii*, o urediniósporo é o tipo de esporo mais comum e a principal estrutura de disseminação, e que podem ser constantemente produzidos em inoculações naturais e artificiais em hospedeiros suscetíveis Ferreira (1983 apud Quecine et al., 2016).

Uma vez que os fungos biotróficos como as ferrugens chegam ao interior do tecido vegetal, o patógeno desenvolve estruturas especializadas conhecidas como haustórios. Estes, por sua vez, fornecem nutrientes suficientes para o desenvolvimento do patógeno e suprimem as respostas de defesa do hospedeiro (Dodds et al., 2009). No entanto, as características moleculares que conduzem adaptações a uma associação biotrófica obrigatória com hospedeiros vegetais ainda não são totalmente conhecidas (Ridout et al., 2006).

Neste sentido, a proteômica se torna uma ferramenta potencial para entender os mecanismos moleculares subjacentes às interações fúngicas com o ambiente, como por exemplo identificar as proteínas presentes em urediniósporos coletados após a infecção de um hospedeiro suscetível é hospedeiro dependente. Atualmente muitos trabalhos utilizando a proteômica como ferramenta para estudos de interação entre planta-patógeno vem sendo desenvolvidos (Figueiredo et al., 2017; Jashni et al., 2019; Bheri; Bhosle; Makandar, 2019; Rampitsch et al., 2019), mas poucos são realizados para o estudo de proteínas provenientes de esporos.

Quecine et al (2016) avaliaram o perfil proteico de populações de de urediniósporos de *A. psidii* coletados de frutos de goiaba (*Psidium guajava*) e de folhas e eucalipto (*Eucalyptus grandis*). Os autores identificaram 340 proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância. Os resultados obtidos permitiram identificar diversos fatores de patogenicidade do fungo e correlacionar com a variação fisiológica fúngica como uma possível estratégia específica de interação com o hospedeiro durante o processo de infecção.

Assim, um estudo proteômico a partir de urediniósporos de *A. psidii* provenientes isolados provenientes e rotineiramente cultivados em seus respectivos hospedeiros *Syzygium jambos* e *Eucalyptus grandis* vem completar estudos prévios realizados, aumentando o conhecimento do

arsenal proteico presente nos urediniósporos desse importante patógeno e pode auxiliar num melhor entendimento de como este patógeno se comporta em diferentes hospedeiros pertencentes à mesma família botânica no período que antecede o processo de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Dois experimentos independentes foram conduzidos para a obtenção de urediniósporos. Três plantas de *Syzygium jambos* e três plantas de *Eucalyptus grandis* suscetíveis foram preparadas, aclimatadas e inoculadas com urediniósporos numa concentração de 10^5 urediniósporos mL^{-1} em solução contendo 0,05% de Tween 20.

Em cada planta foi borrifado 10 mL da solução de urediniósporos, tanto na face adaxial quanto abaxial das folhas. Em seguida as plantas permaneceram, durante um período de 48 horas, dentro de sacos plásticos transparentes para manter a umidade e auxiliar numa melhor germinação dos esporos. Sendo ainda, mantidas no escuro durante as primeiras 24 horas após a inoculação. As plantas permaneceram em câmara de crescimento sob condições de temperatura (20°C) e luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro) controladas. Em ambos os experimentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Plantas de jambo foram inoculadas com urediniósporos (GM-J1) isolado previamente de plantas de jambo e fornecidos pela EMBRAPA Jaguariuna-SP (Lopes, 2017). Já as plantas de eucalipto foram inoculadas com urediniósporos (MF-01) isolado previamente de uma população de campo instalada no município de Itapetininga-SP (Leite, 2012). Ambos isolados são armazenados em freezer (-80°C) e pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”. Esses isolados são rotineiramente repicados em seus respectivos hospedeiros para manutenção dos mesmos.

Ensaio de germinação de urediniósporos MF-01 e GM-J1 *in vitro*

O ensaio de germinação de urediniósporos foi realizado *in vitro*. Os urediniósporos de *A. psidii* coletados de 3 plantas de *E. grandis* e *S. jambos*, MF-01 e GM-J1 respectivamente, 16 d.a.i (dias após a inoculação) foram pesados em porções de aproximadamente 3 miligramas e espalhados, separadamente, com auxílio de pincel em placas de Petri com 10 cm de diâmetro. Estes foram então incubados por 24 horas à 20°C no escuro de acordo com a metodologia proposta por Wietholter et al, 2003. Os meios de cultura utilizados foram o ágar-água (8g.L^{-1}),

distribuindo 20 mL por placa de Petri, bem como ágar-água (8g.L^{-1}) adicionado de 0,5% de uma fonte lipídica (Furtado et al, 2003). Os tratamentos foram: meio ágar-água + urediniósporos *A. psidii* MF-01; meio ágar-água + urediniósporos *A. psidii* GM-J1; meio ágar-água + óleo mineral + urediniósporos *A. psidii* MF-01; meio ágar-água + óleo mineral + urediniósporos *A. psidii* GM-J1. Foram utilizadas 2 placas para cada repetição biológicas, plantas, por tratamento, sendo o ensaio realizado em triplicata. Em cada tratamento foram contados dois mil esporos com ajuda do software Image tool (Versão 3.0). A análise estatística foi realizada mediante teste de Tukey ($p < 0.05$) no programa estatístico R (Gandrud, 2013).

Extração de proteínas

Urediniósporos de *A. psidii* MF-01 e GM-J1, coletados respectivamente de *S. jambos* e *E. grandis*, 16 h.a.i foram submetidas à extração de proteínas. Inicialmente os urediniósporos foram triturados em almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram pesadas, separando 100 gramas de material para cada repetição.

Em cada tubo com urediniósporos triturados foi adicionado 5 mL do tampão de extração [0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 0,7 M Sacarose; 0,1 M Cloreto de potássio; 50 mM EDTA; 1mM PMSF; 2% (v/v) β -mercaptoetanol e 1% (m/v) PVPP (Hurkman; Tanaka, 1986). Em seguida as amostras foram submetidas à agitação (70 rpm) constante por 30 minutos imersos em caixa de isopor com gelo triturado. Logo após foram adicionados 5 mL de uma solução de fenol equilibrado com 10 mM de Tris-HCl pH 8, sendo novamente submetidos ao gelo e agitação constante (70 rpm) por 30 minutos, com posterior centrifugação por 30 minutos a 10.000g à 4°C . O sobrenadante foi recuperado e o processo de adição do tampão de extração, seguido de agitação e centrifugação, foram realizadas por três vezes. O sobrenadante foi recuperado e transferidos para novos tubos, sendo adicionado 10 mL do tampão de precipitação (metanol 100% + 0,1 M acetato de amônio), mantendo as amostras à -20°C *overnight*. No dia seguinte procedeu-se da centrifugação por 20 minutos, a 16.000g e 4°C para obtenção do *pellet* proteico. Os *pellets* foram então lavados com um tampão contendo metanol 100% + 0,1 M de acetato de amônio. Esta lavagem foi realizada três vezes, e entre cada lavagem as amostras foram centrifugadas (16.000g à 4°C), e tinham o sobrenadante descartado. Em seguida 10 mL do tampão foi adicionado e se procedeu do repouso por 1 hora à -20°C . Após estas lavagens e a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e se adicionou às amostras 20 mL de outro tampão de lavagem com acetona 100%, sendo submetidas por 1 hora à -20°C . Seguiu-se novamente à

centrifugação 16.000g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em dissecador à 4°C por 24 horas.

Então as proteínas totais provenientes da extração foram ressuspensas em 300 µL de tampão de solubilização - TCT [7 M uréia, 2 M tiuréia, 10 mM DTT e 0,4% (v/v) Triton X-100], sendo em seguida centrifugados por 30 minutos à 16000g e 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocados em ultrafreezer à -80°C.

Dessalinização das amostras

A dessalinização foi realizada com o auxílio de filtros Amicon®Ultra 3KDa (Millipore), onde ocorreu a substituição do tampão de solubilização ao qual as amostras foram submetidas por um tampão com bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,5, de acordo com as normas indicadas pelo fabricante. Inicialmente as colunas foram hidratadas com 400 µL de água grau MS (Sigma-Audrich), seguindo da centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados aos filtros as amostras no seu volume total (300µL da amostra adicionado de 100µL de água grau MS), e centrifugadas como mencionado anteriormente. Em seguida foram adicionados sempre 400µL de bicarbonato de amônio 50mM com posterior centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Este procedimento foi realizado 5 vezes. Finalmente as amostras foram estocadas à -80°C até se realizar a digestão. Estas estavam em volume final de 300 µL.

Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas presente em cada amostra do estoque (300 µL) foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (Bradford, 1976), com o auxílio de um kit comercial Biorad® e aparelho espectrofotômetro (Hitachi modelo U-3300). As leituras de absorvância foram feitas com comprimento de onda de 595nm, com três repetições. A partir das repetições foram calculadas as médias, e estas utilizadas na equação da reta para obtenção da curva padrão. Assim foram obtidas a concentração de proteínas de cada amostra. Desta forma, para cada amostra 25 ug de proteínas foram separadas em alíquotas para a realização da digestão.

Digestão das proteínas

Uma alíquota de 25 µg de proteína foi aplicada em gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970). Este volume foi somado ao tampão de desnaturação (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (m/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 1% (m/v) Bromofenol Blue), obtendo-se um volume final de 30 µL. A corrida no gel ocorreu por 1 hora, à uma voltagem constante de 50 volts.

Após a corrida do gel, este foi transferido para uma solução fixadora [40%(v/v) etanol e 10%(v/v) ácido acético] por 1 hora, visando a imobilização das proteínas no gel. Em seguida o gel foi transferido para uma solução contendo o corante *Comassie Blue G250*, de acordo com Candiano et al. (2004). Finalmente o gel foi lavado em água MilliQ até serem observados os perfis proteicos de cada amostra. Em seguida, cada banda referente às proteínas totais da amostra, foi retirada e fragmentada em pedaços de aproximadamente 1 mm, realizando, por conseguinte, a digestão a partir do gel de acordo com Shevchenko et al. (1996). As bandas excisadas foram desidratadas em 100 µL acetonitrila 100% por 5 minutos, sendo em seguida removida e seca em centrífuga a vácuo. Foi então adicionado 10 mM de ditioneitol (DTT) em 100 mM de NH₄HCO₃, em volume suficiente para cobrir os pedaços de gel para a redução das proteínas durante 1 hora à 56 °C. As amostras foram resfriadas até atingir a temperatura ambiente, e então a solução de DTT foi substituída por aproximadamente o mesmo volume de 55 mM de iodoacetamida em NH₄HCO₃ (100 mM). Após 45 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, vortexando a cada 9 minutos, os fragmentos de gel foram hidratados com 100 µL de NH₄HCO₃ 100 mM por 10 minutos, sendo então novamente desidratados pela adição de 100 µL de acetonitrila 100%, realizando este procedimento de hidratação e desidratação por mais uma vez. A fase líquida foi removida, e os pedaços de gel foram completamente secos em uma centrífuga a vácuo. Posteriormente foi adicionado ao gel um tampão de digestão de NH₄HCO₃ 50 mM, CaCl₂ 5 mM de e 12,5 ng / µL de tripsina) mantendo a amostra em gelo picado. Depois de 45 minutos, o sobrenadante foi removido e substituído por 100 µL do mesmo tampão, mas sem tripsina. O gel se manteve submerso ao tampão durante a clivagem enzimática (37 ° C, durante a noite).

Os peptídeos foram recuperados pela adição de NH₄HCO₃ 20 mM por uma vez e pela adição de ácido fórmico a 5% em acetonitrila a 50% por três vezes. Entre uma troca e outra de soluções realizou-se o descarte e secagem da fase líquida, as amostras ficaram em repouso durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Após a digestão dos peptídeos as amostras foram purificadas conforme descrito por Rappsilber, Mann e Ishihama (2007).

Análise por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa (LC-MS / MS)

Uma alíquota de 4,5 uL da mistura resultante de peptídeos de cada amostra foi carregada no espectrômetro de massa LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conectado a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY (Proxeon Biosystems, West Palm Beach, FL, EUA) com uma fonte de íons de eletrodos por pulverização.

Os peptídeos foram separados por gradiente de acetonitrila entre 2% e 90% em ácido fórmico a 0,1% usando uma coluna analítica Pico (20cm x ID75 µm, tamanho de 5 µm, novo objetivo, Woburn, MA, EUA), com uma taxa de fluxo de 300nL.min⁻¹ por 45 minutos. Em seguida, os “nanoelectrospray” repeliram a tensão de 1,7kV à 275 °C. Todos os métodos referentes ao equipamento foram configurados no modo de aquisição dependente de dados. A varredura completa dos espectros de MS (m / z 300-1600) foi adquirida pelo analisador Orbitrap após a acumulação no valor-alvo de 1e⁻⁶. A resolução no Orbitrap foi definida como r = 60.000 e os íons peptídicos mais intensos com os estados de carga ≥2 foram isolados sequencialmente para um valor-alvo de 5.000 e fragmentados usando CID de baixa energia (energia de colisão normalizada em 35%). O limite do sinal para acionar um evento MS/MS foi definido para 1.000 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de tamanho de exclusão de 500, com duração de exclusão de 60 segundos e contagem de repetições de 1. Foi usada uma ativação q = 0,25 e tempo de ativação de 10ms.

Análise de dados

Os espectros MS/MS foram gerados a partir do arquivo de dados brutos com o Software Protomas 1.3 (ThermoFisher Scientific) utilizando o mecanismo de busca Sequest (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA; versão 1.4.0.288). Os parâmetros utilizados foram: oxidação de metionina (+ 15.995Da) como modificação não variável, tolerância de 10ppm para precursor e 1,0 Da para íons fragmentos. Para quantificação de proteínas, os arquivos de dados foram analisados no Scaffold Q + (versão Scaffold_4.4.1.1, Proteoma Software, Inc., Portland, OR, EUA) e o valor quantitativo (contas espectrais normalizadas) foram obtidos com os limiares de proteína com uma probabilidade máxima de 90% e pelo menos um peptídeo com limiares

estabelecidos com uma probabilidade mínima de 60% e cortes de $X + 1 > 1,8$, $+ 2 > 2,2$, $+ 3 > 2,5$ e $+ 4 > 3,5$ para manter menos que 1% de FDR. Somente peptídeos com um mínimo de cinco resíduos de aminoácidos, w que apresentaram limiar significativo ($p < 0,05$) no sistema de base de pesquisa, foram considerados como produto da clivagem de peptídeos. O peptídeo foi considerado único, diferenciado no resíduo de aminoácido pelo menos 1; peptídeos covalentemente modificados, incluindo alongamento do terminal N ou C (isto é, clivagens perdidas) foram contados como únicos, e diferentes estados de carga do mesmo peptídeo e modificações não foram contados como únicos.

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de pico (.mgf, formato genérico do Mascot) sem adicionar as varreduras. Como banco de dados, tanto para a análise de proteínas provenientes dos esporos do jambo quanto para o eucalipto, foi utilizado proteínas preditas no genoma de *A. psidii* MF-01. Resumidamente, o sequenciamento de *A. psidii* (MF-01) foi realizado utilizando várias tecnologias de sequenciamento: MiSeq, HiSeq2500 (Pair end e Mate Pair), PacBio e Roche 454. Os dados foram processados, montados e anotados usando vários programas: SPAdes (v.3.9 .1), RepeatMasker (v. 4.0.7), TopHat, Augustus (v. 1.1), PASA (v. 2.1.0), EvidenceModeler (v 1.1.1), Blast (v. 2.6.0), InterproScan, Blast2go (v. 4.1.9 PRO), entre outros (Altschul et al., 1990; Trapnell; Pachter; Salzberg, 2009; Conesa et al., 2005). O alinhamento dos dados RNASeq foi realizado com o genoma de referência mascarado de *A. psidii* (sem a presença de elementos transponíveis e retrotransposons) que contém 47.121 ORFs (dados não publicados).

A quantificação relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo índice de abundância de proteínas exponencialmente modificado (emPAI), obtido no software Mascot Distiller (Ishihama et al., 2005). Os parâmetros de pesquisa incluíram tripsina como protease, com um máximo de 1 clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Foi utilizada tolerância de 0,1 Da para precursor (MS) e fragmento (MS / MS) de íons e massa molecular monoisotópica.

Categorização funcional

As proteínas obtidas foram anotados com termos provenientes do Consórcio *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al. 2000) (<http://www.geneontology.org>) por meio do programa Blast2GO (Conesa et al., 2005). A obtenção dos GO termos foi realizada a partir das sequências obtidas pelo *blastX* e seu mapeamento seguido da anotação dos GO termos em três distintas

categorias funcionais: processo biológico, função molecular e componente celular. Foram utilizados os parâmetros padrões indicados pelo programa.

A partir das anotações foram gerados gráficos com GO termos. Essas anotações foram previamente simplificadas utilizando o recurso GOSlim do programa.

Análise estatística

As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os tratamentos analisados foram acessadas a partir do programa online MetaboAnalyst4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). A matriz de dados gerados (com as proteínas que foram encontradas em pelo menos duas, das três repetições) foi normalizada por transformação em log (*log transformation*) e dimensionados por pareto (*pareto scaling*), a fim de auxiliar na comparação dos dados. Como análise univariada foi realizado a ANOVA. Análises multivariadas também foram geradas, como PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais), e VIPs (importância das variáveis nas projeções multivariadas) com *score* ≥ 1 (Akarachantachote; Chadchan; Saithanu, 2014). A partir destas análises foi possível identificar os fatores que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre as proteínas na comparação entre tratamentos.

RESULTADOS

Germinação de urediniósporos de *A. psidii* provenientes de *E. grandis* (MF-01) e *S. jambos* (GM-J1)

O ensaio de germinação dos urediniósporos de *A. psidii* provenientes de plantas de *E. grandis* (MF-01) e *S. jambos* (GM-J1) demonstrou diferença estatística quando comparado os meios ágar-água e óleo mineral (Figura 1.2). Tanto para os urediniósporos MF-01, quanto para os GM –J1 a maior taxa de germinação foi observada no tratamento com a presença do óleo mineral, chegando a 52,6% de germinação de urediniósporos MF-01 e de 17,9% de germinação de urediniósporos GM-J1. No tratamento composto por meio agar-água somente não houve diferença entre a taxa de germinação de MF-01 e GM-J1 (Figura 1.2).

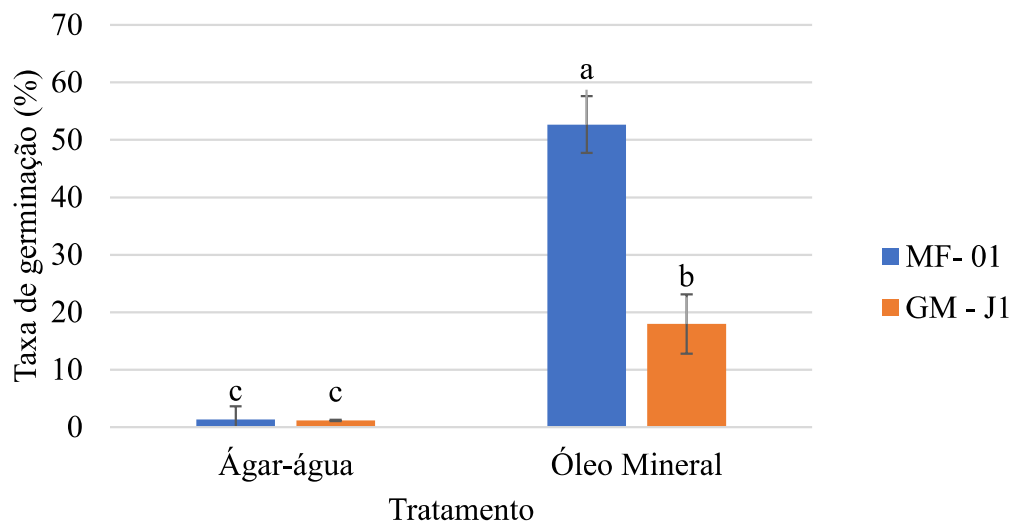


Figura 1.2. Taxa de germinação de urediniósporos MF-01 e GM-J1 de *A. psidii* coletados de plantas de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente. O ensaio foi realizado *in vitro* e analisado 24 horas após inoculação. As barras representam o desvio padrão de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Proteômica de urenidiosporos de *A. psidii* provenientes de *E. grandis* (MF-01) e *S. jambos* (GM-J1)

Foram obtidos no total, 1.028 proteínas relacionadas ao fungo *A. psidii*. Destas, 819 foram identificadas em urediniósporos provenientes de plantas de *E. grandis* e 798 estavam presentes nos urediniósporos coletados de plantas de *S. jambos*. Em relação ao total de proteínas identificadas, 589 proteínas foram comuns entre os urediniósporos de *A. psidii* provenientes de diferentes hospedeiros. Foram observadas 209 proteínas exclusivas em GM-J1 e 230 proteínas exclusivas em MF-01. (Figura 1.3).

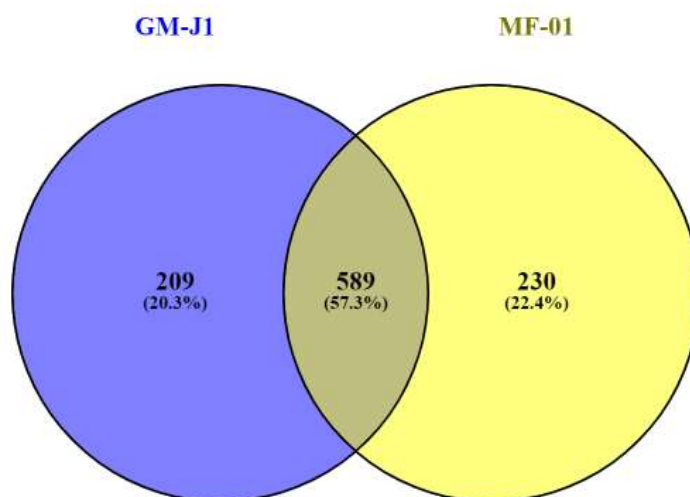


Figura 1.3. Proteínas identificadas em urediniósporos de *A. psidii*. Foram encontradas 209 e 230 proteínas respectivamente em GM-J1 e MF-01 e 589 comuns a ambos isolados.

Por meio da PLS-DA foi possível observar uma separação bem evidente entre o perfil proteico de urediniosporos provenientes *E. grandis* (MF-01) e *S. jambos* (GM-J1). Uma evidência deste contraste, em detrimento da separação em dois grupos distintos, é a soma dos componentes (X+Y), que foi igual a 61% (Figura 1.4).

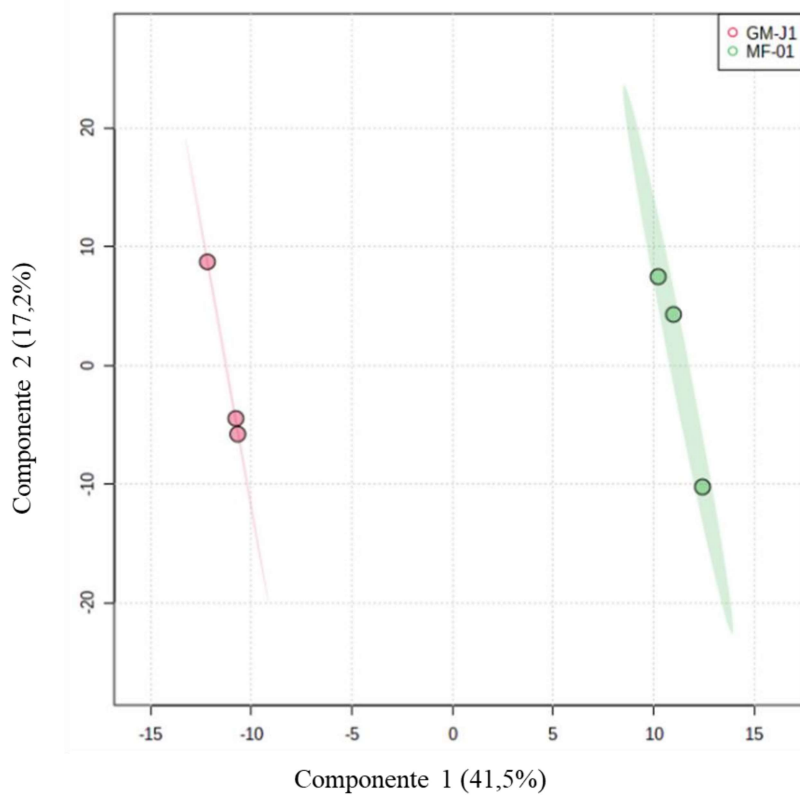


Figura 1.4. *Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)* demonstrando a separação das repetições dentro do mesmo grupo, relacionados às amostras coletadas de urediniósporos de *E. grandis* (MF-01) e de *S. jambos* (GM-J1). $R^2= 0,99$; $Q^2= 0,98$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

Por meio de um agrupamento hierárquico de similaridade foi observado uma separação entre as amostras de acordo com seu grupo, baseado na correlação de *Pearson* e na correlação de *Spearman*. A partir disto, ficou evidente a separação em dois grandes grupos distintos (Figura 1.5).

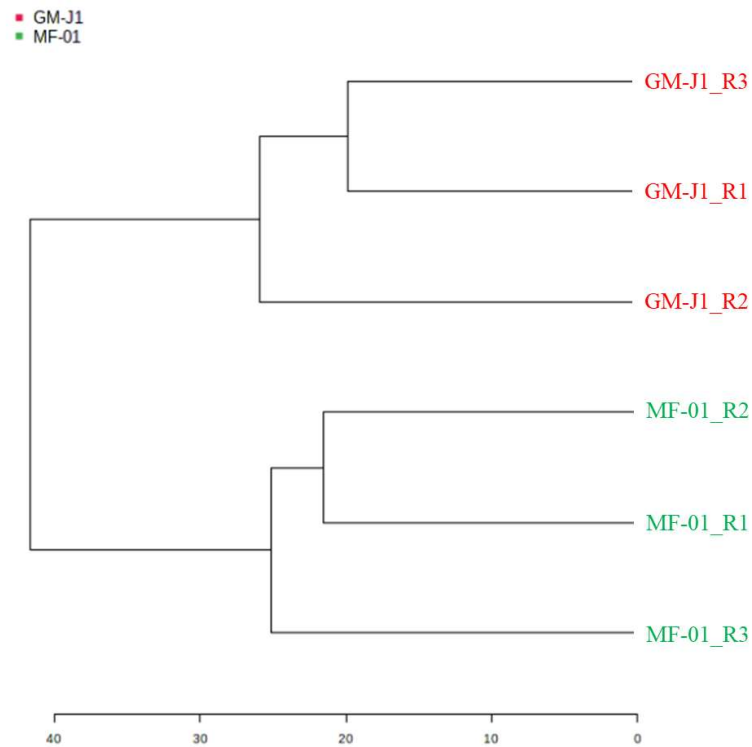


Figura 1.5. Dendrograma gerado a partir de proteínas identificadas de urediniósporos MF-01 e GM-J1. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst, podendo observar dois grupos representados por cada um dos isolados. O nível de similaridade entre os agrupamentos/repetições é medido com base na barra horizontal localizada abaixo do gráfico.

Por meio do BLAST2GO foi observada uma maior quantidade de proteínas com GO termos: Avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos usando plantas para crescimento e purificação dos isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontraram 441 (Fig 1.6).

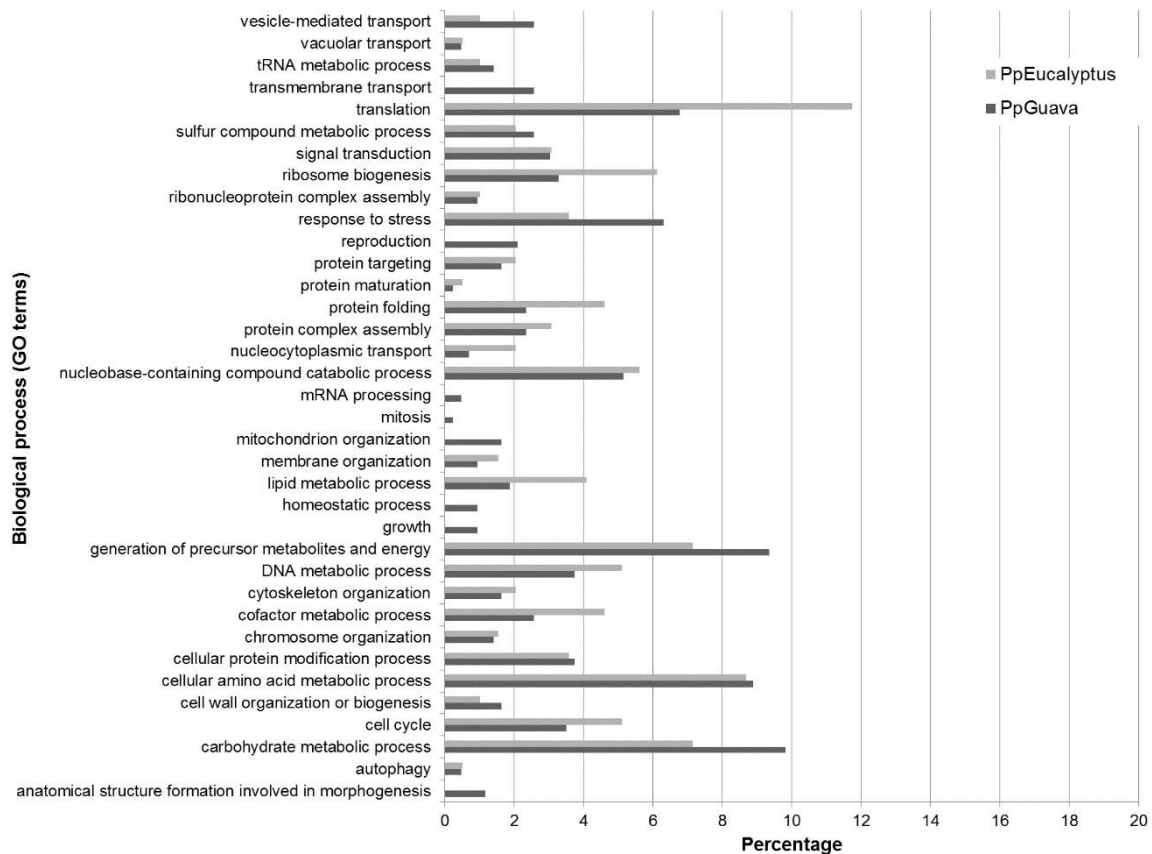


Figura 1.6. Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.

Dentre as 1.028 proteínas totais, foram encontradas 139 com $VIP\ score \geq 1.5$, sendo estas as que mais contribuíram para separação dos grupos MF-01 e GM-J1. Destas, 74 e 65 (entre exclusivas e comuns) proteínas foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância, identificadas em urediniósporos MF-01 e GM-J1, respectivamente (Figura 1.7).

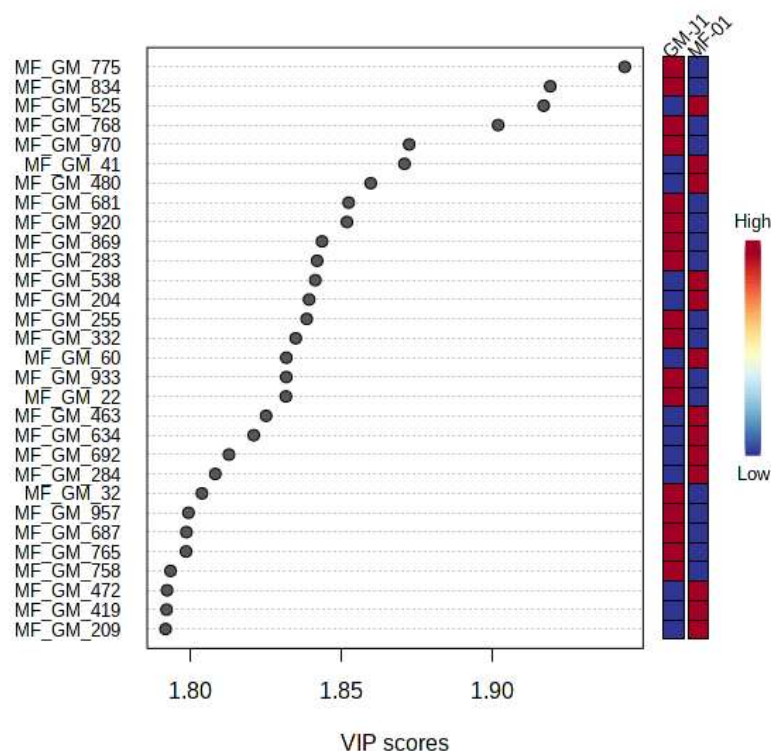


Figura 1.7. *Variable Importance in the Projection (VIP)* com $score \geq 1.5$ das 30 primeiras proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos de urediniósporos MF-01 e GM-J1. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Vermelho – maior abundância.

A partir do estudo proteômico realizado em urediniósporos MF-01 foram identificadas 74 proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância, 16 possuem função desconhecida e 10 não tiveram similaridade com nenhuma proteína do banco de dados (Tabela 1.1). As proteínas *serine/threonine-protein phosphatase*, *aspartate aminotransferase* e *saccharopine dehydrogenase* merecem destaque por serem importantes na fase inicial de infecção em hospedeiros suscetíveis.

Em relação às proteínas encontradas em urediniósporos de GM-J1 65 foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância, 18 têm sua função desconhecida e 14 não tiveram similaridade com nenhuma proteína do banco de dados (Tabela 1.1). Deste total, as proteínas *diphosphomevalonate decarboxylase*, *GMP synthase* e *adenylosuccinate synthetase* também possuem funções importantes nas fases iniciais de infecção do patógeno.

As funções dessas proteínas estão relacionadas desde com a formação do apressório por parte do patógeno até funções de absorção de nutrientes e o conhecimento de enzimas-chave de rotas para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.

Tabela 1.1. Proteínas totais que mais contribuíram para as diferenças de abundância (de acordo com a análise VIP) identificadas em uredinósporos de *A. psidii* MF-01 e GM-J1 provenientes de plantas de *E. grandis* e *S. jambos* respectivamente.

Organismo	Proteínas	ID de acesso ¹	Identificação da proteína ²
MF-01	MF_GM_315	E3L752	<i>Prolyl-tRNA synthetase</i>
	MF_GM_203	A0A180GSZ3	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_171	E3KJW3	<i>Coatomer subunit zeta</i>
	MF_GM_140	E3KKG5	<i>Large subunit ribosomal protein L13Ae</i>
	MF_GM_412	E3KJR8	<i>Aspartate aminotransferase</i>
	MF_GM_242	E3JXG0	<i>60S ribosomal protein L10</i>
	MF_GM_463	KAA1097255.1	<i>Saccharopine dehydrogenase</i>
	MF_GM_14	E3JRS9	<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit</i>
	MF_GM_399	E3KKGZ9	<i>GLUE N-terminal domain-containing protein</i>
	MF_GM_705	E3JRU8	<i>Aminopeptidase</i>
	MF_GM_707	A0A2S4VK93	<i>SHSP domain-containing protein</i>
	MF_GM_442	E3KF54	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_92	A0A5B0QPG6	<i>Actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1</i>
	MF_GM_86	A0A284RHM4	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_684	A0A2H3DBR9	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_246	A5E1T3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>
	MF_GM_532	A0A0L6VEA1	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
	MF_GM_193	A0A1E1MFH3	<i>NACHT domain-containing protein</i>
	MF_GM_212	A0A2H3DBR9	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_450	A0A2H3DBR9	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_504	A0A284RHM4	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_550	A0A284RHM4	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_584	A0A2H3DBR9	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF_GM_540	A0A0C4F8A5	<i>Protein SEY1</i>

MF_GM_752	A0A6M8B7N7	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_542	E3JVK7	<i>GHI6 domain-containing protein</i>
MF_GM_427	E3L5P8	<i>V-type H⁺-transporting ATPase subunit D</i>
MF_GM_772	A0A4Q4NRV6	<i>Ubiquitinyl hydrolase 1</i>
MF_GM_209	E3JTK2	<i>Large subunit ribosomal protein L22e</i>
MF_GM_41	E3KI07	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_808	A0A5B0QMI1	<i>5'-phosphoribosylglycinamide transformylase</i>
MF_GM_197	A0A2S5LBF5	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_464	A0A5B0P2J4	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme synthase A</i>
MF_GM_176	A0A5B0PMW5	<i>Vesicle trafficking between the ER and golgi</i>
MF_GM_472	H6QR85	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_253	A0A1W2H4E9	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_240	A0A165QK50	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_382	A0A5B0RV32	<i>Protein-serine/threonine kinase</i>
MF_GM_538	E3KQI8	<i>AFG3 family protein</i>
MF_GM_350	A0A251VEB5	<i>Putative pentatricopeptide repeat protein</i>
MF_GM_480	A0A0L6UGK4	<i>ATP-binding cassette, sub-family F, member 2</i>
MF_GM_256	Q2GQZ2	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_95	A0A2N5SJF4	<i>Ricin B-type lectin domain-containing protein</i>
MF_GM_704	POW08548.1	<i>hypothetical protein PSST_07423</i>
MF_GM_60	A0A0C4EYC0	<i>Large subunit ribosomal protein L9e</i>
MF_GM_66	A0A5B0PQF1	<i>Chitinase</i>
MF_GM_692	A0A180G783	<i>Uncharacterized protein</i>
MF_GM_675	A0A5B0R3C0	<i>Proteasome subunit beta</i>
MF_GM_736	E3K2J7	<i>WD_REPEATS_REGION domain-containing protein</i>
MF_GM_657	Q4P733	<i>ATP-dependent RNA helicase DEDI</i>
MF_GM_284	A0A5B0NCZ4	<i>Serine/threonine-protein phosphatase</i>

MF_GM_204	--	<i>Not found</i>
MF_GM_662	A0A484FGL9	<i>Drug resistance protein</i>
MF_GM_694	--	<i>Not found</i>
MF_GM_213	E3KU32	<i>Glycerol kinase</i>
MF_GM_344	--	<i>Not found</i>
MF_GM_130	A0A5B0LMN6	<i>NAD-specific glutamate dehydrogenase</i>
MF_GM_36	--	<i>Not found</i>
MF_GM_604	--	<i>Not found</i>
MF_GM_525	O94515	<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>
MF_GM_29	--	<i>Not found</i>
MF_GM_49	P45443	<i>Dynein heavy chain</i>
MF_GM_237	--	<i>Not found</i>
MF_GM_02	--	<i>Not found</i>
MF_GM_526	--	<i>Not found</i>
MF_GM_110	KAA1063854.1	<i>hypothetical protein PGUg99_001336</i>
MF_GM_97	KNF01761.1	<i>hypothetical protein PSTG_04980</i>
MF_GM_634	KNZ52308.1	<i>aspartate-tRNA (Asn) ligase</i>
MF_GM_419	KAA1114007.1	<i>3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase</i>
MF_GM_937	POW16948.1	<i>hypothetical protein PSHT_06538</i>
MF_GM_199	KAA1107053.1	<i>Casein kinase II subunit alpha</i>
MF_GM_645	KAA1092124.1	<i>hypothetical protein PGUg99_013214</i>
MF_GM_84	KAA1067085.1	<i>hypothetical protein PGUg99_032675</i>
MF_GM_220	--	<i>Not found</i>
MF_GM_775	XP_003333304.1	<i>hypothetical protein PGTG_14224</i>
MF_GM_834	XP_003321641.1	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line</i>
MF_GM_768	KAA1077255.1	<i>hypothetical protein PGT21_012358</i>
MF_GM_970	XP_003320656.2	<i>hypothetical protein PGTG_02678</i>

GM-J1

MF_GM_681	KAA1105263.1	<i>MCM DNA helicase complex subunit</i>
MF_GM_920	XP_003321219.1	<i>60S ribosomal protein L7</i>
MF_GM_869	XP_0033334916.1	<i>histone H2A</i>
MF_GM_283	KNZ52899.1	<i>purine nucleoside phosphorylase</i>
MF_GM_255	XP_0033335727.1	<i>isovaleryl-CoA dehydrogenase</i>
MF_GM_332	KAA1079125.1	<i>putative cell survival pathways protein</i>
MF_GM_933	OAV90700.1	<i>isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1</i>
MF_GM_22	KNZ59966.1	<i>ubiquitin-activating enzyme E1</i>
MF_GM_32	XP_003325003.1	<i>adenylosuccinate synthetase</i>
MF_GM_957	XP_007417981.1	<i>uncharacterized protein MELLADRAFT_50916</i>
MF_GM_687	KAA114222.1	<i>hypothetical protein PGT21_004234</i>
MF_GM_765	KAA1123077.1	<i>SF3a splicing factor complex subunit</i>
MF_GM_758	KAA116106.1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>
MF_GM_911	--	<i>Not found</i>
MF_GM_921	OAV89022.1	<i>hypothetical protein PTTG_07129</i>
MF_GM_852	XP_027682260.1	<i>uncharacterized protein LOC102945886</i>
MF_GM_383	KNZ62545.1	<i>ATP-dependent protease La</i>
MF_GM_936	ORE18843.1	<i>diphosphomevalonate decarboxylase</i>
MF_GM_854	OAV94905.1	<i>proteasome component PUP3</i>
MF_GM_437	KNZ53431.1	<i>uncharacterized protein VP01_323g8</i>
MF_GM_793	AIC33814.1	<i>beta-tubulin</i>
MF_GM_997	--	<i>Not found</i>
MF_GM_999	TRZ10689.1	<i>hypothetical protein HGM15179_016399</i>
MF_GM_418	KAA1072926.1	<i>hypothetical protein PGTUg99_026562</i>
MF_GM_301	XP_007416368.1	<i>uncharacterized protein MELLADRAFT_50435</i>
MF_GM_116	--	<i>Not found</i>
MF_GM_912	--	<i>Not found</i>
MF_GM_959	--	<i>Not found</i>
MF_GM_1003	POW10815.1	<i>hypothetical protein PSTT_05725</i>

MF_GM_918	ESK98251.1	<i>60s acidic ribosomal protein p0</i>
MF_GM_879	TFK52566.1	<i>Clavaminate synthase-like protein</i>
MF_GM_952	--	<i>Not found</i>
MF_GM_923	KAA1116106.1	<i>NADH-cytochrome b5 reductase</i>
MF_GM_986	KNZ53541.1	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
MF_GM_1004	--	<i>Not found</i>
MF_GM_826	XP_003321161.1	<i>sterol 24-C-methyltransferase</i>
MF_GM_863	XP_031026918.1	<i>GDP-mannose 4,6-dehydratase</i>
MF_GM_945	--	<i>Not found</i>
MF_GM_941	--	<i>Not found</i>
MF_GM_993	KAA1102221.1	<i>Methionine aminopeptidase 2</i>
MF_GM_763	POW19027.1	<i>hypothetical protein PSHT_05129</i>
MF_GM_983	KNE94571.1	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 26B-A</i>
MF_GM_1012	KAA1074310.1	<i>nucleolar zinc-finger protein</i>
MF_GM_441	XP_003321632.2	<i>hypothetical protein PGTG_03169</i>
MF_GM_695	OAV89113.1	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>
MF_GM_940	XP_003327288.1	<i>GMP synthase</i>
MF_GM_817	KAA1092394.1	<i>telomere binding protein</i>
MF_GM_767	KNZ61444.1	<i>hypothetical protein VP01_139g9</i>
MF_GM_949	--	<i>Not found</i>
MF_GM_900	--	<i>Not found</i>
MF_GM_304	SGZ19814.1	<i>BQ5605_C021g09367</i>
MF_GM_935	KNE95513.1	<i>60S ribosomal protein L1-B</i>
MF_GM_825	--	<i>Not found</i>
MF_GM_894	KNE94185.1	<i>hypothetical protein PSTG_12466</i>
MF_GM_375	--	<i>Not found</i>
MF_GM_730	CAA7057075.1	<i>unnamed protein product</i>
MF_GM_848	RMZ73591.1	<i>vesicle-fusing ATPase</i>

MF_GM_552	PLW23348.1	<i>hypothetical protein PCASD_12312</i>
MF_GM_667	POW05118.1	<i>hypothetical protein PSHT_10947</i>
MF_GM_703	OAV91314.1	<i>Ras-like protein</i>
MF_GM_982	--	<i>Not found</i>

¹ ID de acesso é a identificação de acesso da proteína no banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

² Nome da proteína de acordo com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

DISCUSSÃO

Os basidiomicetos incluem muitos fungos com diversas funções dentro do ecossistema, como decompositores da madeira, simbiotes em plantas bem como agentes de importantes doenças humanas e vegetais (Stajich et al., 2009). Os fungos causadores de ferrugem em plantas compreendem mais de 8.000 espécies, incluindo muitos patógenos das principais áreas agrícolas e com grande importância ecológica (Aime et al., 2017). Uredinia é considerado o estágio do ciclo de vida do patógeno causador de ferrugem que possui grande importância econômica (Kolmer; Ordonez; Groth, 2009), sendo nesta fase responsáveis por quedas na produção devido a doenças causadas em plantas. Os urediniósporos dicarióticos (fase assexuada de reprodução do patógeno) são transportados pelo vento ou chuva, a partir de lesões esporulantes presentes em plantas infectadas para plantas saudáveis, desempenhando um papel crítico na disseminação localizada e à longa distância de muitas ferrugens (Staples, 2000).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com foco nas fases iniciais da infecção de fungos biotróficos em plantas suscetíveis, especificamente durante o processo de germinação dos urediniósporos de basidiomicetos (Leite, 2012; Alves; Junior; Spósito, 2018; Wang et al., 2019). Os estudos nas fases iniciais de infecção tornam-se importantes para que o dano causado pela doença possa ser precocemente controlado, diminuindo as perdas de produção.

Neste trabalho, urediniósporos monopostulares *A. psidii* MF-01 e GM-J1 coletados de plantas de *E. grandis* e *S. jambos* foram submetidos ao teste de germinação *in vitro*, onde foi observado que até as 24 horas de incubação, no meio com a adição de óleo mineral 0,5%, a porcentagem de germinação dos esporos foi maior quando comparado aos resultados obtidos por Bini (2016). No ensaio desenvolvido por Bini (2016) às 24 horas de incubação apenas 2% dos uredósporos de *A. psidii* haviam germinado em condições *in vitro*. No presente trabalho essa taxa de germinação foi bem maior, chegando a 52,6% de uredósporos germinados (MF-01) e à 17,9% de uredósporos germinados (GM-J1). Em relação à presença de estruturas diferenciais iniciais de infecção de *A. psidii*, não foi observada nenhuma alteração até as 24 horas de incubação, semelhantemente ao observado por Bini (2016). Estes resultados podem estar relacionados ao fraco estímulo químico fornecido pela composição do meio de cultura em que foram submetidos os urediniósporos para a germinação quando comparado às condições presentes no hospedeiro do patógeno. Bem como da falta de uma barreira física e a composição química do meio são essenciais para a diferenciação das estruturas normalmente presentes em *A. psidii* durante o processo de infecção *in vivo* (Fauteux et al., 2006; Santos et al., 2019). O

isolado MF-01 aparenta ter uma maior afinidade ao óleo mineral, comparado ao GM-J1. A maior porcentagem de germinação em MF-01 pode estar relacionada à uma melhor resposta ao estímulo do óleo mineral à germinação. Furtado et al (2003) realizou um ensaio para avaliar a germinação de urediniósporos de *A. psidii* provenientes de Eucalipto *in vitro*, avaliando em meio de cultura adicionado de água e óleo mineral como possível estímulo para a germinação. Observou que os urediniósporos tiveram uma porcentagem de germinação superior no tratamento com óleo mineral quando comparado ao tratamento que possuía apenas água. Santos et al. (2019) observaram que a fonte lipídica é essencial para a diferenciação das estruturas de infecção de *A. psidii* em *Eucalyptus* spp., podendo associar as características químicas das ceras extraídas das folhas à uma maior ou menor suscetibilidade da planta ao ataque do fungo. Tessmann e Dianese (2002) extraíram cera de folhas de *S. jambos*, e identificaram a partir de uma análise metabolômica que um composto lipídico (n-Hexano), contribuiu para o aumento de 88% na germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii in vitro*. Indicando a importância de um composto lipídico para uma melhor germinação de urediniósporos de *A. psidii*. Semelhantemente ao observado neste trabalho, onde o tratamento com óleo mineral (fonte lipídica) aumentou consideravelmente a germinação de urediniósporos MF-01 e GM-J1 *in vitro*.

A partir do estudo proteômico realizado com urediniósporos de *A. psidii* coletados de plantas suscetíveis de *E. grandis* e *S. jambos* foi possível observar a presença de algumas proteínas importantes no processo inicial de infecção do fungo. No total de proteínas identificadas, entre as proteínas comuns e exclusivas de MF-01 e GM-J1 foram identificadas 1028 proteínas. No estudo realizado por Quecine et al. (2016), a partir da análise proteômica de populações de urediniósporos *A. psidii* provenientes de *E. grandis* e *P. guava*, identificaram 340 proteínas no total. A partir disto podemos observar que, baseado neste estudo de isolados de *A. psidii*, foi possível aumentar o portfólio de proteínas encontradas em fungos causadores de ferrugem.

Dentre as proteínas comuns e exclusivas em MF-01 e GM-J1 destacam-se os GO termos. Quecine et al. (2016) observaram uma maior abundância de GO termos. em MF-01 e GM-01 Avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos

usando plantas para crescimento e purificação dos isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontrado 441.

Dentre as proteínas identificadas em MF-01 e GM-J1, 74 foram identificadas em urediniósporos de MF-01 e 65 em urediniósporos de GM-J1. Dentre as proteínas encontradas em MF-01, as proteínas *serine/threonine-protein phosphatase*, *aspartate aminotransferase* e *saccharopine dehydrogenase* merecem destaque em diversas etapas do processo de infecção de *A. psidii*. Bem como as proteínas encontradas em GM-J1, como as proteínas *diphosphomevalonate decarboxylase*, *GMP synthase* e *adenylosuccinate synthetase*. Todas essas proteínas estão relacionadas a uma dessas importantes funções nas fases iniciais de infecção do fungo fitopatogênico: formação de apressório, absorção de nutrientes ou no controle pela ação de possíveis agentes antifúngicos.

A topografia da superfície da planta em si pode atuar como um estímulo fundamental para o desenvolvimento inicial do patógeno (Hoch et al., 1987), no entanto uma superfície dura e hidrofóbica também pode desencadear a diferenciação de estruturas de infecção, como apressórios, mesmo em um ambiente sem hospedeiro (Kou; Naqvi, 2016). Esses estímulos para a diferenciação de estruturas do patógeno dependem da sensibilidade da parede celular (Liu et al., 2011), que compreende de uma matriz de proteínas e polissacarídeos que envolvem a célula do fungo. Ela forma o conduto para a percepção de vários estímulos, que então ativam o processo de diferenciação das estruturas do fungo durante o processo de infecção (Geoghegan; Steinberg; Gurr, 2017).

Um dos genes chave envolvido na detecção de estímulos físicos está a mucina transmembrana Msb2 (Liu et al., 2011) que está associada à proteína *serine/threonine-protein phosphatase* (Geoghegan; Steinberg; Gurr, 2017) encontrada neste trabalho em urediniósporos MF-01. Em uma série de fungos patogênicos para plantas, incluindo *M. oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *B. cinerea* e *Ustilago maydis*, a deleção do gene Msb2 resulta em deficiência no desenvolvimento de estruturas de infecção e na penetração dos tecidos vegetais (Lanver et al., 2010). A partir complementação, em mutantes Msb2 silenciados, com compostos ricos em serina/treonina associados à parede celular, foi possível resgatar parcialmente a formação de apressório em *M. oryzae* (Wang et al., 2015).

Ames (2017), a partir de dados provenientes de RNA-Seq de *M. oryzae* mostrou que o gene MGG_09750, associado à enzima CLX0008712, foi *up-regulated* durante a formação do

apressório (4-8 h.a.i) e também durante a fase de maturação do apressório (12-16 h.a.i). A enzima CLX0008712 representa um importante catalizador do segundo estágio da via do mevalonato, juntamente com a proteína *diphosphomevalonate decarboxylase*.

Uma via biossintética de grande importância no processo de infecção causado por organismos patogênicos é a via de metabolismo da purina, sendo essencial em diversas fases do processo infeccioso: conidiogênese, formação de apressório e morfogênese (Cai et al., 2017; Chitty et al., 2017). Baseado na via de metabolismo da purina, Cai et al. (2017) estudaram a doença conhecida como brusone do arroz, causado por *M. oryzae*. A partir do silenciamento do gene MoGuk2, associado à enzima *Guanylate kinase* (GK) observaram que esta desempenha um papel essencial na via de biossíntese *de novo* guanina trifosfato (GTP) e é importante para a morfogênese relacionada à infecção. Duas proteínas deste estudo, que mais contribuíram para as diferenças de abundância em GM-J1, fazem parte da via de metabolismo da purina (*GMP synthase* e *adenylosuccinate synthetase*), e podem ter um importante papel no estudo do processo de infecção nas fases iniciais em plantas de *S. jambos*.

Podendo inferir que a proteína *diphosphomevalonate decarboxylase* é importante no estágio inicial de infecção na planta, estando envolvida na patogenicidade e na formação do apressório. Sendo também mais uma proteína interessante para este estudo, identificada em urediniosporos GM-J1.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes adquiridos pelos hospedeiros de plantas para um melhor desenvolvimento, a absorção deste nutriente pode ocorrer na forma de nitrato, amônia, aminoácidos e outras pequenas moléculas e proteínas (Solomon; Tan; Oliver, 2003).

Os patógenos normalmente estão em condições de N limitantes durante o processo de infecção e adquirem este elemento durante a interação com o hospedeiro, desta forma a deficiência de N é observada a partir de sintomas apresentados por plantas doentes (Snoeijsers et al., 2000; Solomon; Tan; Oliver, 2003). Assim, os patógenos devem desenvolver maneiras eficazes para absorver o N e demais nutrientes para que a colonização nos tecidos do hospedeiro seja eficiente.

A proteína *aspartate aminotransferase* está associada ao processo de infecção do fungo, e pode ser observada pela concentração de nitrogênio em plantas suscetíveis. Baseado nesta hipótese, Wang et al. (2016) a partir de um estudo *in vitro*, identificaram que o fungo oomiceto *Phytophthora sojae* possui a capacidade de produzir *Aspartate aminotransferases* (AATs), que são enzimas fundamentais que coordenam o metabolismo do carbono e do nitrogênio. Os autores demonstraram que silenciando o gene (PsAAT3) associado à AATs reduziu a virulência de *P. sojae* e inibiu seu crescimento em meio sem N. O aumento da expressão de proteínas

relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, degradação de proteínas e a síntese por privação de nitrogênio indicou que eles podem desempenhar papéis importantes na patogenicidade no início da infecção fúngica (Chu et al., 2015).

A L-lisina, um aminoácido essencial para humanos e animais, é sintetizado por bactérias, fungos e algumas plantas. A via biossintética em bactérias e plantas envolve a via do diaminopimelato intermediário (DAP), enquanto em fungos a enzima intermediária é a α -aminoadipato (AA) (Zabriskie; Jackson, 2000). A via AA só existe em fungos, e por isso tem sido considerado como alvo potencial para o desenvolvimento de agentes antifúngicos (Palmer et al., 2004; Milewska et al., 2012).

A via biossintética da lisina é conhecida como uma via conservada no reino fúngico, por isso é considerada como uma característica geral entre fungos fitopatogênicos (Chen et al., 2014). A via biossintética da lisina é composta por diversas enzimas, consideradas enzimas-chave para a rota (Xu et al., 2006), e dentre essas enzimas uma importante é a *Saccharopine dehydrogenase* (León-Ramírez et al., 2010), que também foi encontrada neste estudo em urediniósporos MF-01. A *Saccharopine dehydrogenase* foi relatada possuindo uma função bioquímica específica para fungos (envolvidos na via de síntese de lisina) principalmente associado como potencial alvo para produção de novos compostos antifúngicos (Jastrzebowska; Gabriel, 2015).

Desta forma, a partir do estudo proteômico realizado em urediniósporos MF-01 e GM-J1 foram encontradas diversas proteínas relacionadas a formação de apressório, absorção de nutrientes ou no controle de patógenos pela ação de possíveis agentes antifúngicos. Funções que estão relacionadas/ou que podem suprimir o patógeno, nas fases iniciais de infecção em seus hospedeiros específicos, auxiliando num melhor entendimento de alguns processos que ocorrem na interação patógeno-planta.

REFERÊNCIAS

- AIME, M. Catherine et al. An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 896-905, 2006.
- AIME, M. Catherine et al. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. In: **Advances in genetics**. Academic Press, p. 267-307. 2017.
- AKARACHANTACHOTE, Noppamas; CHADCHAM, Seree; SAITHANU, Kidakan. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v. 94, n. 3, p. 307-322, 2014.
- ALAVI, Peyman et al. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

- ALVES, Renan Fernandes; JUNIOR, Nelson Sidnei Massola; SPÓSITO, Marcel Bellato. Preservation of the urediniospores of *Phakopsora euvitis*, the causal agent of grape leaf rust. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 4, p. 1103-1106, 2018.
- AMES, Ryan M. Using network extracted ontologies to identify novel genes with roles in appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Microorganisms**, v. 5, n. 1, p. 3, 2017.
- ASHBURNER, Michael et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
- BEENKEN, Ludwig et al. *Austropuccinia*: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). **Phytotaxa**, v. 297, n. 1, p. 53-61, 2017.
- BELLINCAMPI, Daniela; CERVONE, Felice; LIONETTI, Vincenzo. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 228, 2014.
- BHERI, Malathi; BHOSLE, Sheetal M.; MAKANDAR, Ragiba. Shotgun proteomics provides an insight into pathogenesis-related proteins using anamorphic stage of the biotroph, *Erysiphe pisi* pathogen of garden pea. **Microbiological research**, v. 222, p. 25-34, 2019.
- BINI, Andressa Peres. **Estudo molecular do desenvolvimento de *Puccinia psidii* Winter in vitro e no processo de infecção em *Eucalyptus grandis***. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CANDIANO, Giovanni et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.
- CAI, Xingjia et al. The atypical guanylate kinase MoGuk2 plays important roles in asexual/sexual development, conidial septation, and pathogenicity in the rice blast fungus. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2467, 2017.
- CHEN, Yue et al. MoLys2 is necessary for growth, conidiogenesis, lysine biosynthesis, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 67, p. 51-57, 2014.
- CHITTY, Jessica L. et al. GMP synthase is required for virulence factor production and infection by *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 7, p. 3049-3059, 2017.
- CHU, Jun et al. Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 5, p. 437-448, 2015.
- CONESA, Ana et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- COUTINHO, T. A. et al. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.
- CUMMINS, George B. et al. Illustrated genera of rust fungi. **American Phytopathological Society (APS Press)**, 2003.
- DODDS, Peter N. et al. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. **New Phytologist**, v. 183, n. 4, p. 993-1000, 2009.
- FAUTEUX, François et al. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*–powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.
- FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, v. 7, n. 2, p. 91-109, 1983.
- FIGUEIREDO, M. B. Life cycle and ecology of *Puccinia psidii*. **O Biológico**, v. 63, p. 69-71, 2001.
- FIGUEIREDO, Andreia et al. Specific adjustments in grapevine leaf proteome discriminating resistant and susceptible grapevine genotypes to *Plasmopara viticola*. **Journal of proteomics**, v. 152, p. 48-57, 2017.
- FURTADO, Gleiber Quintao et al. Germinação de urediniosporos de *Puccinia psidii* Winter em água e óleo mineral. **Summa phytopatológica**, v. 29, n. 4, p. 309-312, 2003.
- GANDRUD, Christopher. **Reproducible research with R and R studio**. CRC Press, 2013.
- GEOGHEGAN, Ivey; STEINBERG, Gero; GURR, Sarah. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 12, p. 957-967, 2017.
- GLEN, M. et al. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy—a review. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.
- GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425-430, 1990.
- HOCH, Harvey C. et al. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. **Science**, v. 235, n. 4796, p. 1659-1662, 1987.
- HOLLOMAN, William K.; SCHIRAWSKI, Jan; HOLLIDAY, Robin. Towards understanding the extreme radiation resistance of *Ustilago maydis*. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 12, p. 525-529, 2007.
- HURKMAN, William J.; TANAKA, Charlene K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.

- ISHIHAMA, Yasushi et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265-1272, 2005.
- JASHNI, Mansoor Karimi et al. Transcriptome and proteome analyses of proteases in biotroph fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. **Journal of Plant Pathology**, p. 1-10, 2019.
- JASTRZEŃBOWSKA, Kamila; GABRIEL, Iwona. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. **Amino acids**, v. 47, n. 2, p. 227-249, 2015.
- KOCHKINA, Galina et al. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 501-509, 2012.
- KOLMER, James A.; ORDONEZ, Maria E.; GROTH, James V. The rust fungi. **eLS**, p. 1-9, 2009.
- KOU, Yanjun; NAQVI, Naweel I. Surface sensing and signaling networks in plant pathogenic fungi. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2016. p. 84-92.
- LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANVER, Daniel et al. Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. **The Plant Cell**, v. 22, n. 6, p. 2085-2101, 2010.
- LEITE, Thiago Falda. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.
- LEÓN-RAMÍREZ, Claudia G. et al. A molecular probe for Basidiomycota: the spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase chimeric gene. **FEMS microbiology letters**, v. 312, n. 1, p. 77-83, 2010.
- LIU, Wende et al. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 1, p. e1001261, 2011.
- LOPES, Mariana da Silva. **Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de *Austropuccinia psidii***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2017.
- MCTAGGART, A. R. et al. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. **Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 729-734, 2018.
- MILEWSKA, Maria J. et al. Antifungal activity of homoaconitate and homoisocitrate analogs. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14022-14036, 2012.
- MOORE-LANDECKER, Elizabeth. **Fungal spores**. eLS, 2001.
- MORIN, Louise et al. Investigating the host-range of the rust fungus *Puccinia psidii* sensu lato across tribes of the family Myrtaceae present in Australia. **PLoS One**, v. 7, n. 4, 2012.
- MORIN, Louise; TALBOT, Mark J.; GLEN, Morag. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. **Fungal biology**, v. 118, n. 2, p. 253-263, 2014.
- PALMER, D. R. J. et al. Synthesis and antifungal properties of compounds which target the α -amino adipate pathway. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 2, p. 93-98, 2004.
- PÉTRIACQ, Pierre; STASSEN, Joost HM; TON, Jurriaan. Spore density determines infection strategy by the plant pathogenic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. **Plant Physiology**, v. 170, n. 4, p. 2325-2339, 2016.
- PINTO, Carlos A. et al. Effects of high-pressure processing on fungi spores: Factors affecting spore germination and inactivation and impact on ultrastructure. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 553-573, 2020.
- QUECINE, Maria Carolina et al. Label-free quantitative proteomic analysis of *Puccinia psidii* uredospores reveals differences of fungal populations infecting eucalyptus and guava. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. e0145343, 2016.
- RAMPITSCH, Christof et al. Temporal quantitative changes in the resistant and susceptible wheat leaf apoplastic proteome during infection by wheat leaf rust (*Puccinia triticina*). **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1291, 2019.
- RAPPSILBER, Juri; MANN, Matthias; ISHIHAMA, Yasushi. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896, 2007.
- RIDOUT, Christopher J. et al. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. **The Plant Cell**, v. 18, n. 9, p. 2402-2414, 2006.
- RUIZ, R. A. R.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. Effect of temperature, light and inoculum source on teliospore and urediniospore production of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 70-73, 1989.
- SANTOS, Isaneli Batista dos et al. The *Eucalyptus* cuticular waxes contribute in preformed defense against *Austropuccinia psidii*. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1978, 2019.
- SEDLÁŘOVÁ, Michaela et al. The role of nitric oxide in development and pathogenesis of biotrophic phytopathogens—downy and powdery mildews. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, 2016. p. 263-283.
- SHEVCHENKO, Andrej et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.

- SIMPSON, J. A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C. A. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 549-562, 2006.
- SNOEIJERS, Sandor S. et al. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 6, p. 493-506, 2000.
- SOLOMON, Peter S.; TAN, Kar-Chun; OLIVER, Richard P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.
- STAJICH, Jason E. et al. Primer--the fungi. **Current biology: CB**, v. 19, n. 18, p. R840, 2009.
- STAPLES, Richard C. Research on the rust fungi during the twentieth century. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 49-69, 2000.
- TESSMANN, DAURI J.; DIANESE, JOSÉ C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 538-542, 2002.
- TRAPNELL, Cole; PACHTER, Lior; SALZBERG, Steven L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.
- TURGEMAN, Tidhar et al. The role of aquaporins in pH-dependent germination of *Rhizopus delemar* spores. **PLoS One**, v. 11, n. 3, 2016.
- VAN LONG, Nicolas Nguyen et al. Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. **International journal of food microbiology**, v. 241, p. 151-160, 2017.
- WANG, Guanghui et al. Activation of the signalling mucin MoM sb2 and its functional relationship with C bpl in *Magnaporthe oryzae*. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2969-2981, 2015.
- WANG, Rongbo et al. PsAAT3, an oomycete-specific aspartate aminotransferase, is required for full pathogenicity of the oomycete pathogen *Phytophthora sojae*. **Fungal biology**, v. 120, n. 4, p. 620-630, 2016.
- WANG, Erpei et al. Carotenoid complement of rust spores: Variation among species and pathotype. **Phytochemistry**, v. 161, p. 139-148, 2019.
- WIETHÖLTER, Nicola et al. Differences in the methyl ester distribution of homogalacturonans from near-isogenic wheat lines resistant and susceptible to the wheat stem rust fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 10, p. 945-952, 2003.
- WINTER, G. Rabenhorstii Fungi europaei et extraeuropaei. **Cent. XXXI et XXXII. Hedwigia**, v. 23, p. 163-175, 1885.
- XU, Yan et al. Mal-Lys: prediction of lysine malonylation sites in proteins integrated sequence-based features with mRMR feature selection. **Scientific reports**, v. 6, p. 38318, 2016.
- ZABRISKIE, T. Mark; JACKSON, Michael D. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. **Natural product reports**, v. 17, n. 1, p. 85-97, 2000.

3. *Syzygium jambos* x *Austropuccinia psidii*: ESTUDO PROTEÔMICO VISANDO UM MELHOR ENTENDIMENTO DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Resumo

Análises proteômicas durante o processo de infecção entre fungos e plantas têm contribuído para o entendimento de processos que envolvem a morfogênese, virulência e respostas ao hospedeiro. Podendo também, auxiliar para na identificação de vias específicas e o desenvolvimento de enzimas-alvo para a produção de drogas antifúngicas. *Austropuccinia psidii* é um fungo biotrófico, agente causal ferrugem das mirtáceas. No Brasil, o patógeno foi inicialmente detectado infectando goiabeiras (*Psidium guajava*) e posteriormente foi detectado em eucalipto (*Eucalyptus grandis*). *Syzygium jambos* também é da família das Mirtáceas, e pode ser infectado com *A. psidii*. Recentemente vem sendo bastante estudada auxiliando em um melhor entendimento da relação planta-patógeno acerca dessa doença. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi entender, a partir de um estudo proteômico, como é a relação *A. psidii*-*S. jambos* durante o processo de infecção. Urediniósporos de GM-J1 foram inoculados em plantas suscetíveis de *S. jambos*, folhas foram coletadas às 0, 72, 144 e 336 horas após a inoculação, e a partir daí foi realizado o monitoramento, por qPCR, do patógeno na planta. Foi possível observar que às 336 h.a.i a quantidade (pg) de DNA de GM-J1 estava maior em relação aos outros tempos amostrados. A partir da análise realizada em espectrômetro de massas Q-ToF PREMIER acoplado a um instrumento RP-nano UPLC foi realizado um estudo proteômico durante o processo de infecção (0, 144 e 336 h.a.i) de GM-J1 em plantas suscetíveis de *S. jambos*. Foi possível identificar 11 proteínas totais associadas à GM-J1, sendo 9 (0 h.a.i); 7 (144 h.a.i) e 6 (336 h.a.i). Destas, 3 (0 h.a.i); 3 (144 h.a.i) e 1 (336 h.a.i) foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância. Foi possível identificar também 118 proteínas totais associadas à *S. jambos*, sendo: 87 (0 h.a.i); 69 (144 h.a.i) e 63 (336 h.a.i). Destas, 36 (0 h.a.i); 11 (144 h.a.i) e 11 (336 h.a.i) foram as que mais contribuíram para as diferenças de abundância. As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância foram identificadas a partir da análise VIP. Como destaque em cada tempo avaliado, em relação à função da proteína associada a GM-J1, foi possível observar que a proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (0 h.a.i), pode ter um papel importante para a germinação de urediniósporos; *glycine dehydrogenase* e *heat shock protein SSB* (144 h.a.i), associados ao crescimento do micélio e patogênica; e *heat shock protein 60* (336 h.a.i), envolvida em ações relacionada à colonização, infecção e patogenicidade do fungo. Foram também identificadas proteínas importantes no processo de defesa da planta contra o ataque do patógeno: *photosystem II protein D2* e *photosystem I reaction center subunit III* (0 h.a.i); *pathogenesis-related protein STH-2-like* e *translationally-controlled tumor protein homolog* (144 h.a.i); *major allergen Pru ar 1* e *plastocyanin* (336 h.a.i). Estes resultados podem indicar que a partir das proteínas encontradas no estudo podemos ter um melhor entendimento acerca do que ocorre durante o processo de infecção, na interação *A. psidii* – *S. jambos*.

Palavras-chave: proteômica; *Austropuccinia psidii*; *Syzygium jambos*; interação planta-patógeno.

***Syzygium jambos* x *Austropuccinia psidii*: proteomic study for a better understanding of plant-pathogen interaction**

Abstract

Proteomic analyzes during the process of infection between fungi and plants have contributed to the understanding of processes involving morphogenesis, virulence and responses to the host. It can also assist in the identification of specific pathways and the development of target enzymes for the production of antifungal drugs. *Austropuccinia psidii* is a biotrophic fungus, a causal agent of rust in the mirtaceae. In Brazil, the pathogen was initially detected by infecting guava trees (*Psidium guajava*) and was later detected in eucalyptus (*Eucalyptus grandis*). *Syzygium jambos* is also in the Mirtaceae family, and can be infected with *A. psidii*. Recently it has been extensively studied, helping to better understand the plant-pathogen relationship about this disease. In this sense, the objective of this work was to understand, from a proteomic study, how is the *A. psidii*-*S. jambos* relationship during the infection process. Urediniospores of GM-J1 were inoculated in susceptible plants of *S. jambos*, leaves

were collected at 0, 72, 144 and 336 hours after inoculation, and thereafter the pathogen was monitored by qPCR in the plant. It was possible to observe that at 336 h.a.i the amount (pg) of GM-J1 DNA was greater in relation to the other sampled times. From the analysis performed on a Q-ToF PREMIER mass spectrometer coupled to an RP-nano UPLC instrument, a proteomic study was carried out during the infection process (0, 144 and 336 hai) of GM-J1 in susceptible plants of *S. jambos*. It was possible to identify 11 total proteins associated with GM-J1, being 9 (0 h.a.i); 7 (144 h.a.i) and 6 (336 h.a.i). Of these, 3 (0 h.a.i); 3 (144 h.a.i) and 1 (336 h.a.i) were the ones that most contributed to the differences in abundance. It was also possible to identify 118 total proteins associated with *S. jambos*, being: 87 (0 h.a.i); 69 (144 a.i.) and 63 (336 a.i.). Of these, 36 (0 h.a.i); 11 (144 h.a.i) and 11 (336 h.a.i) contributed the most to differences in abundance. The proteins that most contributed to the differences in abundance were identified from the VIP analysis. As a highlight in each evaluated time, in relation to the function of the protein associated with GM-J1, it was possible to observe that the protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (0 h.a.i), may have an important role for the germination of urediniospores; glycine dehydrogenase and heat shock protein SSB (144 h.a.i), associated with mycelial growth and pathogenesis; and heat shock protein 60 (336 h.a.i), involved in actions related to colonization, infection and pathogenicity of the fungus. Important proteins were also identified in the plants defense process against pathogen attack: photosystem II protein D2 and photosystem I reaction center subunit III (0 h.a.i); pathogenesis-related protein STH-2-like and translationally-controlled tumor protein homolog (144 h.a.i); major allergen Pru ar 1 and plastocyanin (336 h.a.i). These results may indicate that based on the proteins found in the study, we can have a better understanding of what happens during the infection process. in the interaction *A. psidii* - *S. jambos*.

Keywords: proteomics; *Austropuccinia psidii*; *Syzygium jambos*; plant-pathogen interaction.

INTRODUÇÃO

Os patógenos vegetais são frequentemente classificados como necrotróficos ou biotróficos, dependendo da estratégia de infecção (Glazebrook, 2005; Nishimura; Dangl, 2010). Os patógenos necrotróficos matam as células hospedeiras vivas e usam o tecido vegetal em decomposição como substrato para colonizar a planta, enquanto os patógenos biotróficos parasitam as células vegetais empregando muitas vezes moléculas efetoras que suprimem o sistema imunológico do hospedeiro (Pel; Pieterse, 2013). Apesar dessa classificação binária, a maioria dos micróbios patogênicos emprega uma estratégia de infecção hemibiotrófica, caracterizada por uma fase biotrófica inicial seguida por uma estratégia de infecção necrotrófica nos estágios posteriores da infecção (Perfect; Green, 2001).

Os fungos biotróficos são um grupo importante de patógenos vegetais (Hahn, 2000; Bushnell, 2012). Como biotróficos obrigatórios os fungos causadores de ferrugem só podem se alimentar, crescer e se reproduzir colonizando o hospedeiro vivo. Esta colonização ocorre a partir da diferenciação de estruturas específicas de infecção chamadas haustórios, necessários para estabelecer interações íntimas dentro de tecidos hospedeiros infectados (Kemen; Agler; Kemen, 2015; Aime et al., 2017; Dracatos et al., 2018).

Austropuccinia psidii é um fungo biotrófico, agente causal ferrugem das mirtáceas. No Brasil, o patógeno foi inicialmente detectado infectando goiabeiras (*Psidium guajava*) (Winter,

1885) e posteriormente foi detectado em eucalipto (*Corymbia citriodora*, syn. *Eucalyptus citriodora*) (Joffily, 1944). Esse patógeno possui ainda uma ampla gama de hospedeiros, com mais de 450 espécies hospedeiras pertencentes à Myrtaceae (Giblin; Carnegie, 2014), uma grande família de plantas com mais de 5.600 espécies (Grattapaglia et al., 2012). A hipótese é que esse patógeno biotrófico causador da ferrugem seja autoécio (Morin; Talbot; Glen, 2014; McTaggart et al., 2018; McTaggart et al., 2020), completando seu ciclo de vida em brotos e frutos em crescimento ativo de hospedeiros suscetíveis sob condições de temperatura moderada e longos períodos de alta umidade (Coutinho et al., 1998; Glen et al., 2007; Stewart et al., 2018). No entanto, informações sobre a biologia de *A. psidii* ainda não são totalmente conhecidas.

Em diversas partes de mundo o patógeno *A. psidii* já foi relatado infectando plantas da família das Mirtáceas, como *Heteropyxis natalensis* (Alfnas et al., 2005), *Eucalyptus* spp. (Junghans et al., 2003; Maier et al., 2010; Quecine et al., 2016; Berthon et al., 2019), *Psidium guajava* (Winter, 1885; Quecine et al., 2016), *Syzygium jambos* (Tessmann et al., 2001; McTaggart et al., 2017; McTaggart et al., 2018). Esta última, por sua vez, ganhou bastante importância recentemente com a possível descoberta referente ao fechamento do ciclo sexual do fungo durante infecção da mesma (McTaggart et al., 2017; McTaggart et al., 2020).

A origem geográfica de *S. jambos*, popularmente conhecido como maçã rosa varia desde o Sudeste da Ásia até a região de Kerala na Índia, indochina e Iêmen. O jambeiro, como também é conhecido, cresce bem no clima tropical úmido e no solo argiloso e profundo. Esta espécie é uma árvore perene com quase 10 m de altura e 50 cm de diâmetro (Lim, 2012). As folhas são coriáceas, com muitas glândulas pelúcidas, e tornam se verde escuro a partir de um tom rosado (Lim, 2012). As flores agrupadas são branco-esverdeadas com pétalas côncavas. Os frutos têm a pele amarelada em forma de pêra quando maduros e podem ser comidos frescos (Mohamed et al., 2014). Suas folhas são usadas como diurético e podem tratar reumatismo e aliviar os olhos doloridos (Kuiate et al., 2007; Nawwar et al., 2016). Suas sementes são usadas para tratar catarro, diabetes, diarreia e disenteria (Kuiate et al., 2007; Sharma et al., 2013). O consumo da casca pode aliviar bronquite e asma (Sharma et al., 2013). Um estudo recente também descreveu a imunomodulação e propriedades anti-inflamatórias de *S. jambos* (Tamiello et al., 2017). Outras notáveis propriedades medicinais incluem o poder antioxidante (Donatini et al., 2009; Selvam et al., 2013), antimicrobiano (Mohanty; Cock, 2010; Sharma et al., 2013), anti-úlceras (Donatini et al., 2009), antinociceptivo (Avila-Peña et al., 2007), hepatoprotetor (Selvam et al., 2013) e efeitos hipoglicêmicos (Gavillán-Suárez et al., 2015). Além de possuir um alto teor polifenólico e um conteúdo de polissacarídeo péctico considerável (Tamiello et al., 2017). Apesar da grande quantidade de estudos relacionados às propriedades medicinais de *S. jambos*

(Hossain et al., 2016; Rajkumari et al., 2018; Tamiello et al., 2018), estudos proteômicos sobre a interação com patógenos causadores de ferrugem permanecem incipientes.

Para auxiliar na elucidação da complexa interação planta-patógeno, muitas das pesquisas moleculares têm como objetivo compreender o sistema imune da planta e as ferramentas utilizadas pelo patógeno para superar o sistema de defesa do hospedeiro (Cook; Mesarich; Thomma, 2015). Dentre as diversas técnicas que podem ser utilizadas no estudo da interação planta-patógeno, a proteômica vem recebendo cada vez mais destaque. A proteômica é uma estratégia de estudo dinâmica que está sendo constantemente renovada para cada vez mais obter respostas claras sobre o papel das proteínas expressas em um organismo vivo. Anualmente, há uma explosão de novos protocolos e plataformas com melhorias contínuas feitas em todas as etapas do fluxo de trabalho, desde as realizadas em laboratório (fracionamento de tecidos e células, extração de proteínas, depleção, purificação, separação, análise de MS) até a análise final utilizando computadores (algoritmos para identificação de proteínas e ferramentas de bioinformática para análise de dados, bancos de dados e repositórios) (González-Fernández; Prats; Jorin-Novo, 2010).

Análises proteômicas em fungos patogênicos têm contribuído para o entendimento de processos que envolvem a morfogênese, virulência e respostas ao hospedeiro podendo também, atuar no desenvolvimento de alvos para drogas antifúngicas e diagnósticos clínicos das doenças, essas análises auxiliam na identificação de proteínas antigênicas. Também podem fornecer informações sobre a interação entre proteínas-alvo e agentes antifúngicas aumentando com isso a compreensão dos mecanismos de patogenicidade (Pitarch et al., 2003).

É sabido que muitas vezes o proteoma é influenciado pela interação com o hospedeiro, sendo essas informações de vital importância para o melhor entendimento da interação planta-patógeno. M'Barek et al (2015) apresentaram um primeiro catálogo de proteínas de *Zymoseptoria tritici* secretado no apoplasto de trigo durante o processo de infecção. Identificaram uma grande quantidade de proteínas, o que fornece um rico recurso para entender melhor o papel destas proteínas durante a patogênese de *Z. tritici*.

Abbai et al. (2016), a partir de um estudo comparativo entre espécies resistentes e suscetíveis de trigo ao fungo biotrófico *Puccinia triticina*, identificaram proteínas diferencialmente expressas durante a interação planta-patógeno. Foram reveladas a presença de diversas categorias de proteínas associadas à defesa, fotossíntese, reparo de nucleotídeos, replicação de DNA, síntese protéica e elementos transponíveis. E, pela primeira vez, a expressão diferencial de uma proteína relacionada ao reparo de nucleotídeos.

Li et al (2017) analisaram o proteoma de folhas de trigo inoculadas com o fungo biotrófico *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, o agente causal da doença conhecida como oídio. Foram identificadas 46 proteínas únicas que foram diferencialmente expressas nos tempos de inoculação avaliados. Segundo os autores, os resultados obtidos mostram a relevância do metabolismo das plantas sobre as respostas de defesa durante a interação planta-patógeno, fornecendo novos conhecimentos sobre a biologia do trigo suscetível em resposta à infecção por *B. graminis*.

Mandelc et al (2009) estudaram dois fitotipos de *Verticillium albo-atrum*, sendo observada a expressão diferencial de proteínas por micélios crescidos em meio de cultura. Por meio da Análise de Componente Principal (PCA) foi observada que essa diferenciação estava fortemente correlacionada com o grau de agressividade do patógeno. Paper et al. (2007) usou LC-MS/MS na identificação de proteínas secretadas por *Fusarium graminearum* após crescimento *in vitro* e *in planta* durante o processo de infecção de trigo, sendo observado que 56% das proteínas identificadas *in planta* tinham peptídeos sinal, sendo várias proteínas *housekeeping* não observadas *in vitro*, demonstrando uma específica interação com o hospedeiro.

Um estudo foi realizado a partir da análise proteômica de urediniósporos de *A. psidii* provenientes de de goiabeira e eucalipto, sendo identificadas 340 proteínas relacionadas à urediniósporos do patógeno. Foram observadas mudanças em relação à abundância de proteínas de acordo com a planta estudada, mostrando uma variação fisiológica das populações do fungo, com estratégias específicas na interação com seu hospedeiro (Quecine et al., 2016).

Mediante a relevância de estudos do patossistema *A. psidii* - *S. jambos* inicialmente foi realizado de maneira inédita o qPCR para acompanhar a infecção do fungo no interior da planta no decorrer do tempo. Finalmente, o estudo para o entendimento da interação planta-patógeno, a partir da análise do perfil proteico de *A. psidii* durante o processo de infecção em *S. jambos*, visando o melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade do fungo e de resposta da planta.

METODOLOGIA

Material biológico

Mudas de *S. jambos*, suscetíveis à ferrugem das Mirtáceas, foram adquiridas de viveiro comercial, possuindo aproximadamente 0,8 centímetros de altura. As plantas foram mantidas

em casa de vegetação localizada no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (22° 42' 30" S and 47° 38' 30" W). Estas foram podadas a cerca de 30 centímetros da base para renovação de ramos, facilitando a estruturação das mudas para a realização dos cuidados necessários. Rotineiramente as plantas foram irrigadas, adubadas e podadas visando a manutenção da estrutura e sanidade das plantas para a realização de ensaios.

Para a infecção do jambo foram utilizados urediniósporos de *A. psidii*, isolados de *S. jambos* e fornecidos pela EMBRAPA Jaguariúna-SP. Este isolado foi caracterizado como GM-J1 (Lopes, 2017) e pertence à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”.

Inoculação de *A. psidii* GM-J1 em plantas de *S. jambos*

Para o estudo inicial do processo de infecção do patógeno em *S. jambos*, quatro plantas suscetíveis e saudáveis foram separadas, aclimatados e inoculados com a urediniósporos de GM-J1 (10^5 esporos mL^{-1}) conforme metodologia descrita por Leite (2012). As plantas foram submetidas a condições homogêneas, com temperatura de 20°C e 12 horas de luz por dia, para garantir uma infecção eficiente do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Os intervalos de estudo estabelecidos para amostragem do material biológico foram: (1) zero hora após a inoculação (h.a.i) com inóculo - controle, (2) 72 h.a.i, (3) 144 h.a.i e (4) 336 h.a.i.

Em cada intervalo, folhas provenientes dos dois primeiros pares de cada ramo, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas individualmente à -80°C. Foi coletado material suficiente para a extração de DNA, RNA e proteínas em cada um dos tempos propostos.

Monitoramento do patógeno por qPCR

A extração do DNA foi realizada utilizando-se *DNeasyPlant Mini Kit* (Qiagen) segundo recomendações do fabricante. A quantificação do DNA de cada amostra foi realizada em Nanodrop2000 (Termo Fisher). Após a extração do DNA, as reações de qPCR foram preparadas, para detecção e monitoramento do patógeno *A. psidii* nos diferentes tempos amostrados. Foi obtido um volume final de 25 μl , contendo: 12,5 μl de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG* (Invitrogen), 0,02 mg ml^{-1} de BSA, 5 pmol de cada primer (IGS7: 5'-

CAAAGTTATTTCTGGATCAC-3’; e IGS9: 5’-CATTCTAGTGAATTTTCTTTAC-3’) (Bini et al., 2018) e 5 ng de DNA (1 ng μL^{-1}). A programação utilizada no aparelho foi: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, para coleção de dados e análise em tempo real e, 72-85°C por 30 segundos, com incremento de temperatura a cada 2 ciclos de 0,5°C para curva de *melting*, coleção dos dados e análise (Bini et al., 2018).

Para quantificação do DNA genômico de GM-J1 presente nas amostras vegetais, uma curva padrão foi desenvolvida a partir da diluição em série (50 ng; 5 ng; 0,5 ng; 0,05 ng; 0,005 ng; e 0,0005 ng). O DNA de urediniósporos foram extraídos e diluídos em DNA de plantas saudáveis de Jambo (1 ng μL^{-1}). A curva padrão de cada diluição em série foi feita em triplicata, e, as amostras do ensaio do *real time* foram feitas em duplicatas, com quatro repetições biológicas, por intervalo de tempo. A média e o erro padrão do ciclo limiar (Ct) obtido nas repetições técnicas foram calculadas e usadas para os cálculos da quantidade de *A. psidii* em cada diluição seriada e amostra.

Análise proteômica de *A. psidii* durante a infecção de *S. jambos*

Extração das proteínas

Folhas com urediniósporos do patógeno proveniente de plantas de *S. jambos* foram submetidas à extração de proteínas nos tempos: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i.

Inicialmente as folhas de jambo foram trituradas em almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram pesadas para a obtenção de uma massa comum entre tratamentos e repetições, totalizando 200 mg de material vegetal por amostra.

Em cada tubo com material vegetal triturado foi adicionado 7,5 mL do tampão de extração [0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 0,7 M Sacarose; 0,1 M Cloreto de potássio; 50 mM EDTA; 1mM PMSF; 2% (v/v) β -mercaptoetanol e 1% (m/v) PVPP (Hurkman; Tanaka, 1986). Em seguida as amostras foram submetidas à agitação (70 rpm) constante por 30 minutos imersos em caixa de isopor com gelo triturado. Logo após foram adicionados 7,5 mL de uma solução de fenol equilibrado com 10 mM de Tris-HCl pH 8, sendo novamente submetidos ao gelo e agitação constante (70 rpm) por 30 minutos, com posterior centrifugação por 30 minutos a 10.000g à 4°C. O sobrenadante foi recuperado e o processo de adição do tampão de extração, seguido de agitação e centrifugação, foram realizadas por três vezes. O sobrenadante foi recuperado e transferidos para novos tubos, sendo adicionado 20 mL do tampão de precipitação (metanol

100% + 0,1 M acetato de amônio), mantendo as amostras à -20°C *overnight*. No dia seguinte procedeu-se da centrifugação por 20 minutos, a 16.000g e 4°C para obtenção do *pellet* proteico. Os *pellets* foram então lavados com um tampão contendo metanol 100% + 0,1 M de acetato de amônio. Esta lavagem foi realizada três vezes, e entre cada lavagem as amostras foram centrifugadas (16.000g à 4°C), e tinham o sobrenadante descartado. Em seguida 15 mL do tampão foi adicionado e se procedeu do repouso por 1 hora à -20°C. Após estas lavagens e a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e se adicionou às amostras 30 mL do tampão de lavagem II (com acetona 100%), sendo submetidas por 1 hora à -20°C. Seguiu-se novamente à centrifugação 16.000g por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em dissecador à 4°C por 24 horas.

As proteínas totais provenientes da extração foram ressuspensas em 300 µL de tampão de solubilização - TCT [7 M uréia, 2 M tiuréia, 10 mM DTT e 0,4% (v/v) Triton X-100], sendo em seguida centrifugados por 30 minutos à 16000g e 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocados à -80°C.

Dessalinização das amostras

A dessalinização foi realizada com o auxílio de filtros Amicon®Ultra 3KDa (Millipore), onde ocorreu a substituição do tampão de solubilização ao qual as amostras foram submetidas por um tampão com bicarbonato de amônio 50 mM e pH 8,5, de acordo com as normas indicadas pelo fabricante. Inicialmente as colunas foram hidratadas com 400 µL de água grau MS (Sigma-Audrich), seguindo da centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados aos filtros as amostras no seu volume total (300µL da amostra adicionado de 100µL de água grau MS), e centrifugadas como mencionado anteriormente. Em seguida foram adicionados sempre 400µL de bicarbonato de amônio 50mM com posterior centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Este procedimento foi realizado 5 vezes. Finalmente as amostras foram estocadas à -80°C até se realizar a digestão. Estas estavam em volume final de 300 µL.

Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas presente em cada amostra do estoque (300 μL) foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (Bradford, 1976), com o auxílio de um kit comercial Biorad® e um aparelho espectrofotômetro Hitachi modelo U-3300. As leituras de absorvância foram feitas com comprimento de onda de 595nm, com três repetições. A partir das repetições foram calculadas as médias, e estas utilizadas na equação da reta para obtenção da curva padrão. Assim foram obtidas a concentração de proteínas, em $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, em cada amostra. Desta forma, 50 μg de proteínas foram separadas em alíquotas para a realização da digestão.

Digestão em gel SDS-PAGE

Para cada amostra em estudo (50 μg), foram adicionados 25 μL de 2% (v/v) de solução surfactante (RapiGEST SF), sendo incubados por 15 minutos a 80°C. Em seguida se realizou a redução das amostras, com a adição de 2,5 μL de ditioneitol (DTT) 100 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK), mantendo por 30 minutos a 60°C. Então se realizou a alquilação das amostras, com a adição de 2,5 μL de iodoacetamida (IAA) 300 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK), neste momento foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente por 30 minutos. Para obtenção dos peptídeos, foram adicionados 10 μL de solução de tripsina (50 ng. μL^{-1}) sendo a amostra mantida a 37°C por 16 horas. Completada a digestão, foi adicionado a cada amostra 10 μL de TFA (Ácido trifluoroacético) 5% (v/v) para bloquear a ação da tripsina. As amostras ficaram incubadas por 90 minutos à 37°C. Posteriormente as amostras seguiram para a centrifugação, onde permaneceram por 30 minutos a 14000 g à 6°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Finalmente a solução de proteínas digeridas foi seca em concentrador à vácuo (Concentrador 5301, *Eppendorf*).

Purificação de peptídeos provenientes da digestão de amostra complexa

Após a secagem das amostras à vácuo, foi adicionado 50 μL da solução de 0,1% de TFA em H_2O , realizando a ressuspensão das mesmas. A partir deste momento iniciou a purificação das amostras com o auxílio de micro colunas de fase reversa (*Reverse phase Zip-Tip C18*,

Millipore®), com 10 µL de cada vez, realizando 5 vezes para cada amostra. Esta purificação foi obtida a partir do equilíbrio na solução A [100% acetonitrila (ACN), 0,1% (v/v) TFA]; solução B [50% (v/v) ACN:H₂O, 0,1% (v/v) TFA] e solução C [100% H₂O, 0,1% (v/v) TFA], respectivamente. Por meio do equilíbrio realizado, os peptídeos permaneceram aderidos à coluna, então foi feita a lavagem para retirada de possíveis impurezas com a solução D [95% H₂O, 5 % (v/v) metanol, 0,1% (v/v) TFA], sendo repetida por 3 vezes. Finalmente foi realizada a eluição dos peptídeos, onde 10µL da solução B foi pipetada e concentrada em tubos de vidro borosilicato (Waters Total Recovery Vials). Foi obtido novamente os 50 µL iniciais da amostra. Estas, outra vez, seguiram para a concentração a vácuo.

Separação dos peptídeos por cromatografia líquida 2D e obtenção dos espectros

Para análise de proteínas por espectrometria de massa, uma alíquota de 4,5 µL resultante da digestão peptídica foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP-nano UPLC (Waters nanoACQUITY UPLC, Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplada ao Q-Espectrômetro de massa Tof (espectrômetro de massa Micromass® Q-ToF PREMIER, Waters Corporation, Milford, MA, EUA) com uma fonte de nano eletropulverização a uma taxa de fluxo de 0,600 µL.min⁻¹. As amostras foram avaliadas em duplicatas. Um gradiente de 2 a 90% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% foi mantido por 45 min. A voltagem do nano eletropulverizador foi mantida em 3,5 kV, com voltagem do cone de 30 V e temperatura da fonte de 100 µC. O instrumento foi operado de modo que um espectro de massa é adquirido, seguido por MS / MS dos três picos mais intensos detectados. Após a fragmentação da MS / MS, o íon foi mantido na lista de exclusão por 60 s. Para análise de peptídeos de clivagem endógena, foi utilizado um tempo de exclusão real.

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de pico (.mgf, formato genérico do Mascot) sem adicionar as varreduras. Foi utilizado como em formato .fasta foi baixado do National Center of Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a busca de proteínas relacionadas ao Eucalipto, mirtácea com genoma sequenciado, para o estudo no jambo. Resumidamente, o sequenciamento de *A. psidii* (MF-01) foi realizado utilizando várias tecnologias de sequenciamento: MiSeq, Hiseq2500 (Pair end e Mate Pair), PacBio e Roche 454. Os dados foram processados, montados e anotados usando vários programas: SPAdes (v.3.9 .1), RepeatMasker (v. 4.0.7), TopHat,

Augustus (v. 1.1), PASA (v. 2.1.0), EvidenceModeler (v 1.1.1), Blast (v. 2.6.0), InterproScan, Blast2go (v. 4.1.9 PRO), entre outros (Altschul et al., 1990; Trapnell; Pachter; Salzberg, 2009; Conesa et al., 2005). O alinhamento dos dados RNASeq foi realizado com o genoma de referência mascarado de *A. psidii* (sem a presença de elementos transponíveis e retrotransposons) que contém 47.121 ORFs (dados não publicados).

A quantificação relativa de cada proteína na base, referência para o banco de dados, o trabalho publicado por Myburg et al. (2014). O arquivo mistura foi determinada pelo índice de abundância de proteínas exponencialmente modificado (emPAI), obtido no software Mascot Distiller (Ishihama et al., 2005). Os parâmetros de pesquisa incluíram tripsina como protease, com um máximo de 1 clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Foi utilizada tolerância de 0,1 Da para precursor (MS) e fragmento (MS / MS) de íons e massa molecular monoisotópica.

Categorização funcional

As proteínas obtidas foram anotados com termos provenientes do Consórcio *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al., 2000) (<http://www.geneontology.org>) por meio do programa Blast2GO (Conesa et al., 2005). A obtenção dos GO termos foi realizada a partir das sequências obtidas pelo *blastX* e seu mapeamento seguido da anotação dos GO termos em três distintas categorias funcionais: processo biológico, função molecular e componente celular. Foram utilizados os parâmetros padrões indicados pelo programa.

A partir das anotações foram gerados gráficos com GO termos. Essas anotações foram previamente simplificadas utilizando o recurso GOSlim do programa.

Análise estatística

As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os tratamentos analisados foram identificadas a partir do programa *online* MetaboAnalyst4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). A matriz de dados gerados (com as proteínas que foram encontradas em pelo menos duas, das três repetições) foi normalizada por transformação em *log* (*log transformation*) e dimensionados por pareto (*pareto scaling*), a fim de auxiliar na comparação dos dados. Como análise univariada foi realizada a ANOVA. Análises multivariadas foram geradas, como PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais) e VIPs (importância das variáveis nas projeções multivariadas) com $score \geq 1$

(Akarachantachote; Chadchan; Saithanu, 2014). A partir destas análises foi possível identificar os fatores que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre as proteínas na comparação entre tratamentos (0, 144 e 336 h.a.i).

RESULTADOS

Monitoramento de *A. psidii* GM-J1 durante infecção de *S. jambos*

Foi observado a partir do monitoramento de *A. psidii* GM-J1 em plantas suscetíveis de *S. jambos* por qPCR que a presença do patógeno é aumentada à medida que o tempo de infecção aumenta. Às 0 h.a.i já foi possível detectar o patógeno (12,48 pg de DNA) em folhas de jambo, aumentando muito às 144 h.a.i (1.586 pg de DNA), chegando às 336 h.a.i com um forte aumento (42.405 pg de DNA). É válido destacar que, segundo análise estatística realizada, não há diferença entre os tempos zero e 72 h.a.i. A partir das 144 h.a.i a detecção do patógeno é aumentada, atingindo o ápice às 336 h.a.i (Figura 2.1).

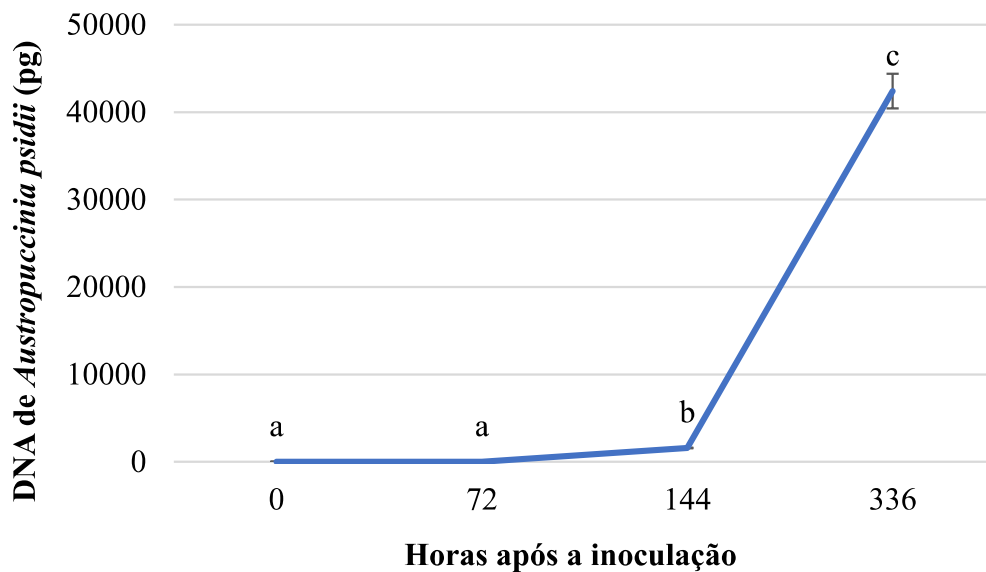


Figura 2.1. Quantificação de *Austropuccinia psidii* GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos*. Para analisar a quantidade (pg) de DNA de GM-J1 presente no tecido foliar infectado, a média de quatro repetições foram determinadas em cada ponto de tempo de amostragem; as barras verticais representam o desvio padrão; letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o Teste de Tukey.

Proteínas de *A. psidii* (GM-J1) identificadas durante o processo de infecção em *S. jambos*

Durante o processo de infecção de *A. psidii* em plantas de *S. jambos* suscetíveis foram identificados, no total, 11 proteínas relacionadas à GM-J1. Deste total, 7 foram comuns em no mínimo dois tratamentos. Foram encontradas 3, 0 e 1 proteínas exclusivas para às 0, 144 e 336 h.a.i, respectivamente (Figura 2.2). Considerando as proteínas totais identificadas em cada tratamento foi possível observar que às 0 h.a.i foi encontrado o maior número de proteínas, seguido por 144 h.a.i e 336 h.a.i, com 9, 7 e 6 proteínas, respectivamente. Foram identificadas proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância nos três tempos analisados, com 3 às 0 h.a.i, 3 às 144 h.a.i e 1 às 336 h.a.i.

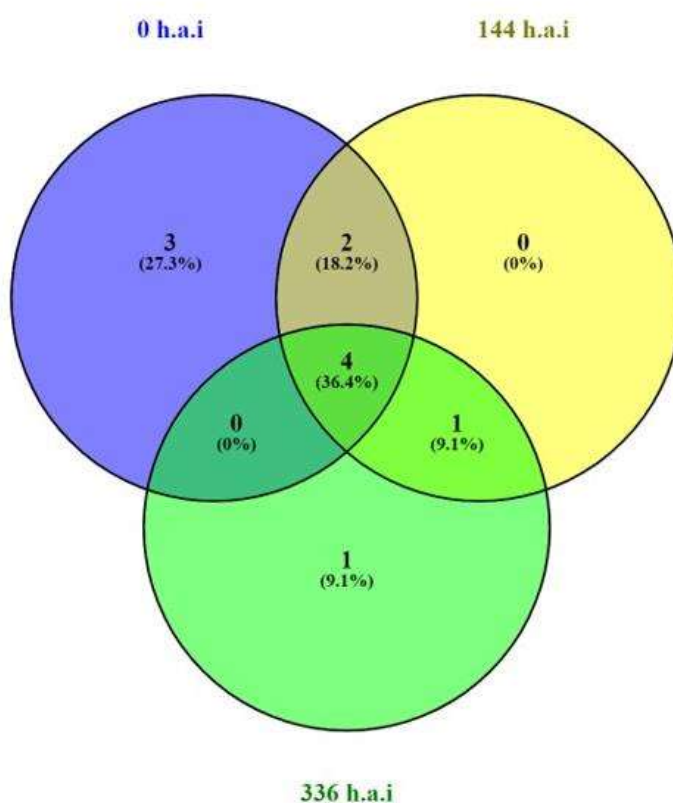


Figura 2.2. Proteínas identificadas de GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos*. Indicando o número de proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção estudados.

Com o conjunto de proteínas identificados a partir do estudo realizado durante o processo de infecção de *A. psidii* em *S. jambos*, de acordo com a análise multivariada PLS-DA,

foi possível observar que as amostras foram subdivididas em três grupos distintos. Onde cada um correspondeu a um dos tempos analisados. Uma evidência deste contraste, para dar maior suporte (base estatística) da separação nos grupos distintos observados, é a soma dos componentes (X+Y), que foi igual a 61,4% (Figura 2.3).

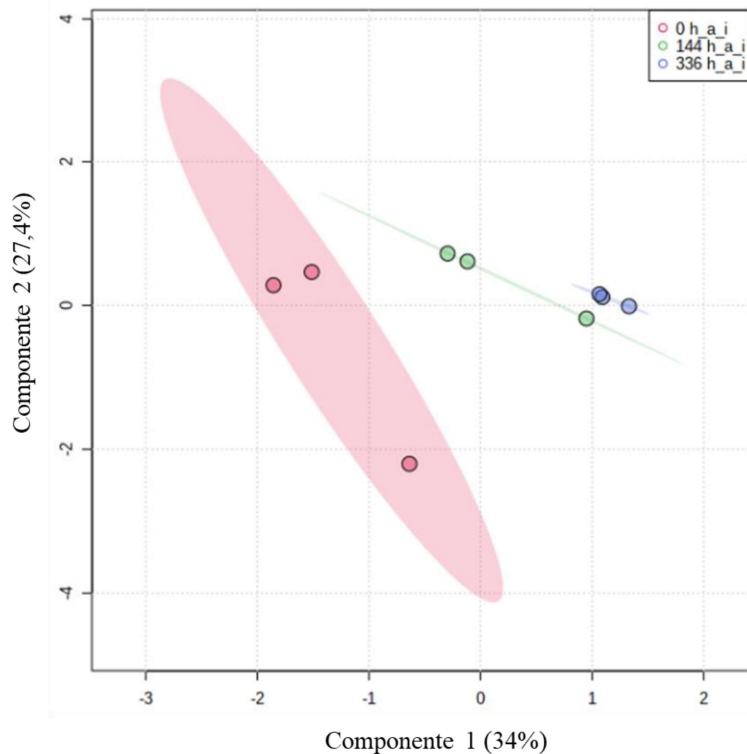


Figura 2.3. *Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)* mostrando a separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos* nos tempos: 0 horas, 144 horas e 336 horas após a inoculação. $R^2 = 0,98$; $Q^2 = 0,94$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

Em relação a categorização funcional as proteínas identificadas em GM-1, foi observado uma preponderância de GO termos. Dentre as proteínas comuns e exclusivas em MF-01 e GM-J1 destacam-se os GO termos. Quecine et al. (2016) observaram uma maior abundância de GO termos. Em MF-01 e GM-01 avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos usando plantas para crescimento e purificação dos

isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontrado 441.

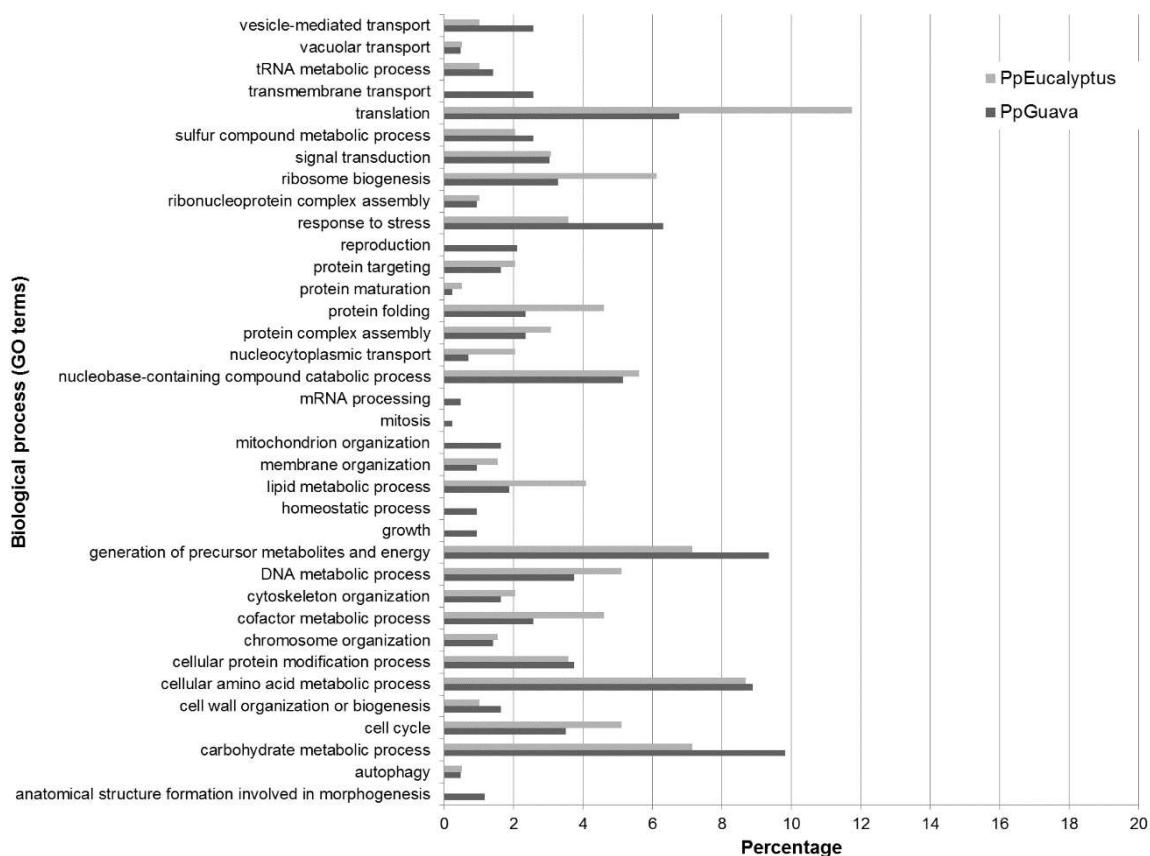


Figura 1.4. Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.

Por meio da análise VIP, foi possível observar quais as proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos formados. Bem como a concentração da proteína no decorrer do tempo de interação do patógeno com a planta suscetível (Figura 2.5).

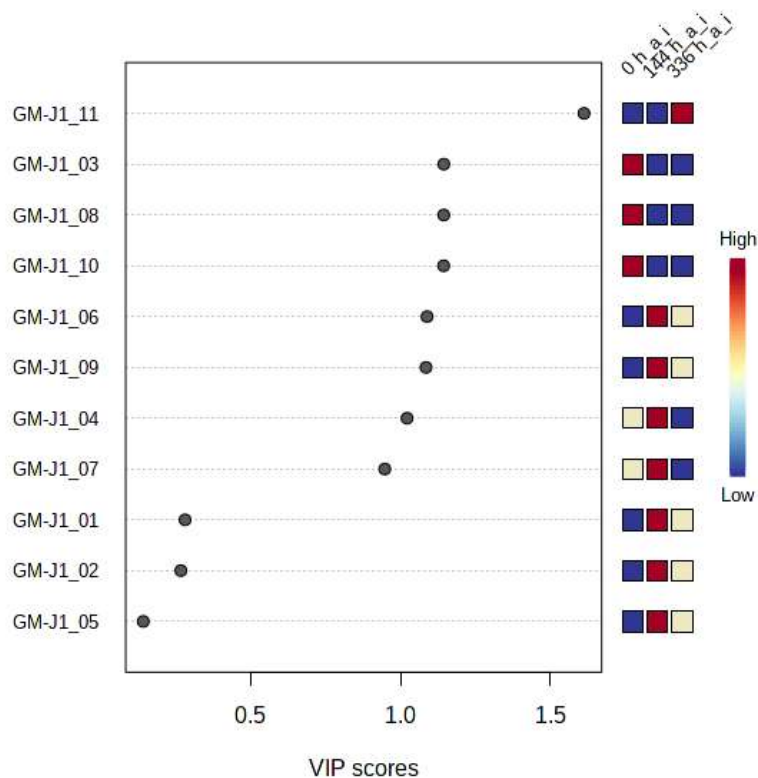


Figura 2.5. Variable Importance in the Projection (VIP) com $score \geq 1$ das proteínas de *A. psidii* (GM-J1) que mais contribuíram para a separação dos grupos durante a infecção em *S. jambos* em todos os tempos analisados: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

As proteínas associadas ao fungo *A. psidii* (GM-J1) foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância durante o período de infecção em plantas suscetíveis de *S. jambos*: *beta-alanine synthase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *hypothetical protein PGTUg99_034374* (0 h.a.i); *glutamyl-trna amidotransferase subunit a*, *glycine dehydrogenase*, *heat shock protein SSB* (144 h.a.i); *heat shock protein 60* (336 h.a.i) (Tabela 2.1). Como destaque em cada tempo avaliado, em relação à função da proteína no processo infeccioso, foi possível observar que a proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (0 h.a.i), pode ter um papel importante para a germinação de urediniósporos; *glycine dehydrogenase* e *heat shock protein SSB* (144 h.a.i), associados ao crescimento do micélio e patogenicidade; e *heat shock protein 60* (336 h.a.i), envolvida em ações relacionada à colonização, infecção e patogenicidade do fungo.

Tabela 2.1. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em urediniósporos de *A. psidii* coletados de *S. jambos*.

Tempo	Proteínas	Característica	ID de acesso ¹	Nome da proteína ²
0 horas	GM-J1_03	Exclusiva?	OHW89892.1	<i>beta-alanine synthase</i>
	GM-J1_08		P53429	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
	GM-J1_10		KAA1068343.1	<i>hypothetical protein PGTUg99_034374</i>
144 horas	GM-J1_06		EPE04615.1	<i>glutamyl-trna amidotransferase subunit a</i>
	GM-J1_09		RLV87650.1	<i>glycine dehydrogenase</i>
	GM-J1_04		KNE96469.1	<i>heat shock protein SSB</i>
336 horas	GM-J1_11		XP_020069862.1	<i>heat shock protein 60</i>

¹ ID de acesso é a identificação de acesso da proteína no banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

² Nome da proteína de acordo com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

Estudo proteômico de plantas de *S. jambos* inoculadas com *A. psidii*

Foi possível identificar 118 proteínas relacionadas a *S. jambos*. Do total de proteínas identificadas, 87 foram identificadas às 0 h.a.i, 69 às 144 h.a.i, e 63 às 336 h.a.i.

Em relação ao total de proteínas identificadas, 38 proteínas são comuns entre todos os tempos analisados, e 63 estavam presentes em pelo menos dois dos três tempos avaliados. Foram identificadas proteínas exclusivas em todos os tempos estudados, observando 29 às 0 h.a.i, 9 às 144 h.a.i e 17 às 336 h.a.i (Figura 2.6).

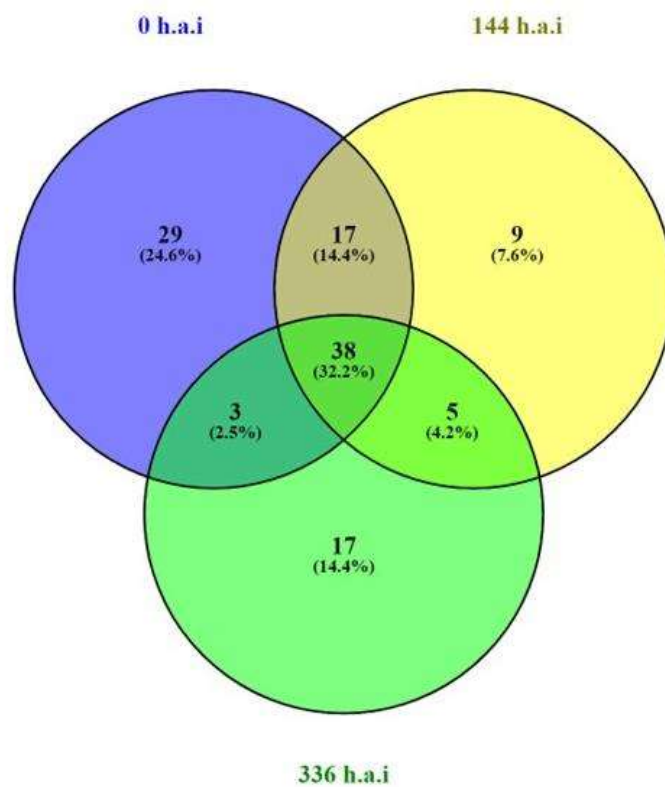


Figura 2.6. Proteínas identificadas de *S. jambos* inoculados com *A. psidii* GM-J1 durante a interação planta-patógeno. Indicando o número de proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção estudados.

A análise multivariada PLS-DA indica que as amostras estão distribuídas em três grupos distintos entre si, onde cada grupo representa o tempo de coleta de material realizado neste estudo: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i do patógeno *A. psidii* em plantas suscetíveis de *S. jambos* (Figura 2.7).

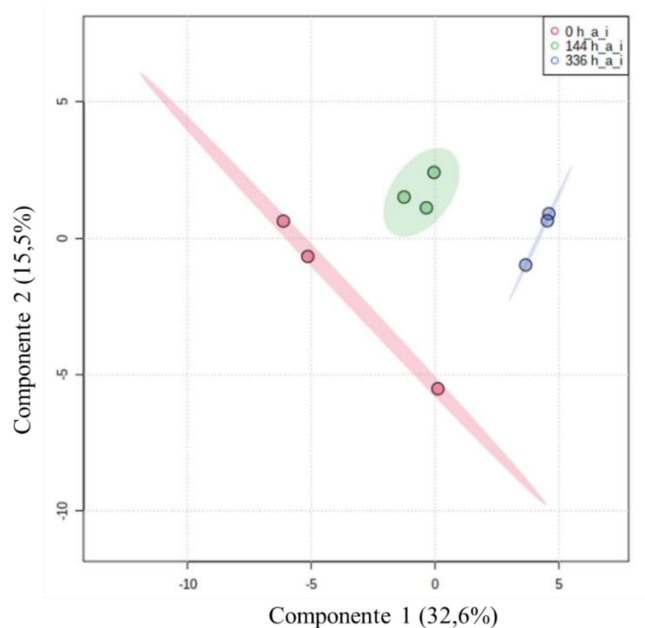


Figura 2.7. *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) mostrando a separação das repetições dentro do mesmo grupo, relacionados às amostras para análise de proteínas identificadas em *S. jambos* inoculadas com *A. psidii* nos tempos: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. $R^2= 0,97$; $Q^2= 0,93$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

Em relação a categorização funcional as proteínas identificadas em GM-1, foi observado uma predominância de GO termos. Quecine et al. (2016) observaram uma maior abundância de GO termos. Me MF-01 e GM-01 Avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos usando plantas para crescimento e purificação dos isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontraram 441 (figura 2.8).

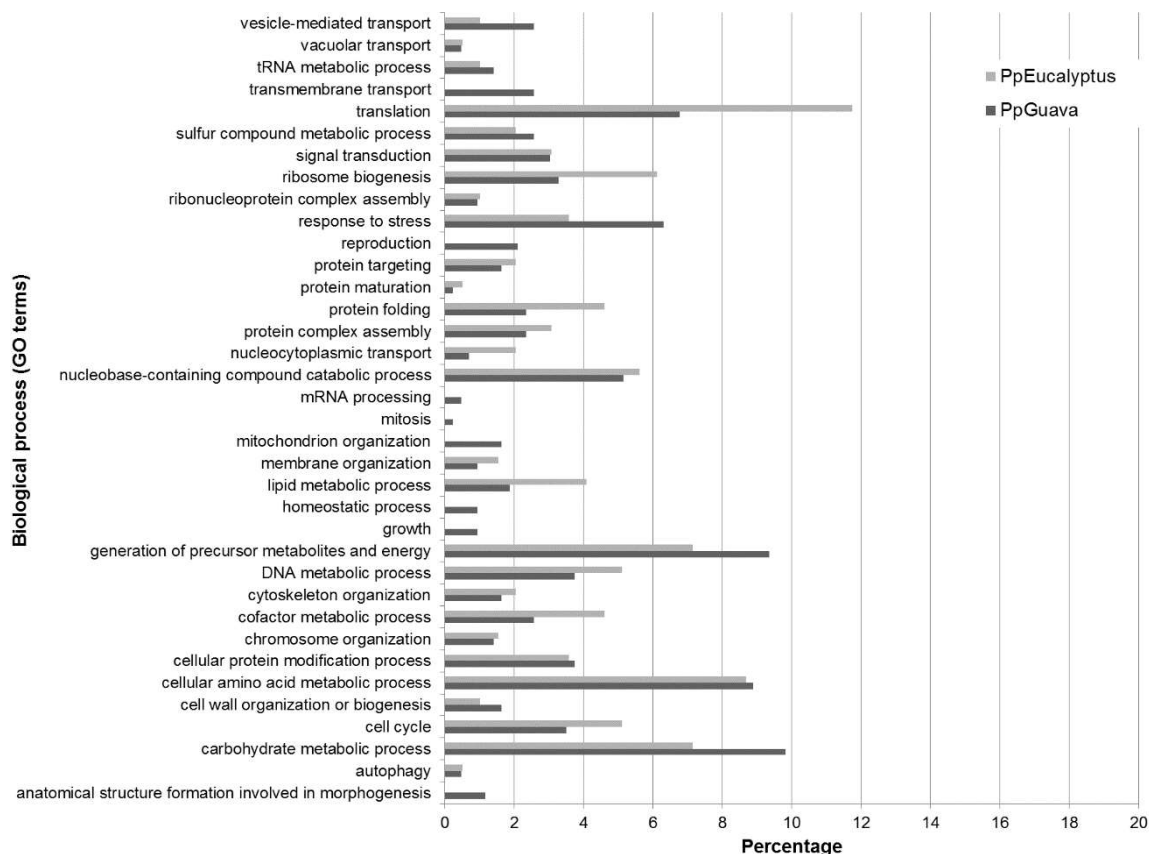


Figura 2.8. Ontologia genética de termos de processos biológicos na análise proteômica. O gráfico de barras representa a proporção de% da composição do termo na proteômica dados.

Baseado na análise VIPs foi possível identificar quais proteínas, que mais contribuíram para as diferenças de abundância, e o tratamento que a proteína esteve mais abundante durante a interação infecciosa do patógeno com a planta (Figura 2.9).

Em relação às proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância, a maior quantidade foi identificada às 0 h.a.i com 36 proteínas. Quanto às proteínas encontradas às 144 h.a.i, apesar do grande número de proteínas totais constatadas, apenas 11 foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância. Com o tempo de coleta do material às 336 h.a.i foram identificadas 11 proteínas como que mais contribuíram para as diferenças de abundância.

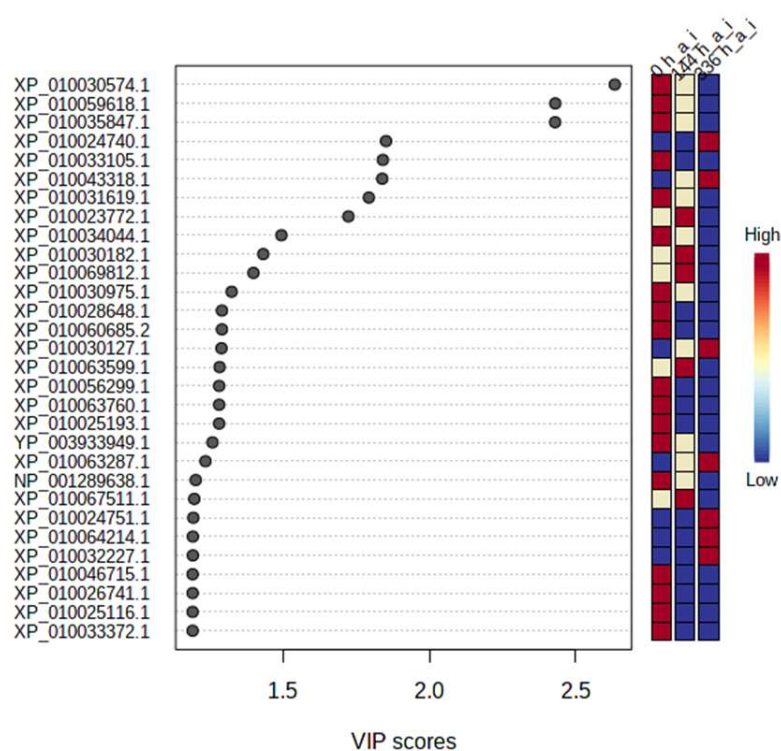


Figura 2.9. Variable Importance in the Projection (VIP) com $\text{score} \geq 1$ das proteínas de *S. jambos* que mais contribuíram para a separação dos grupos quando inoculados com o fungo *A. psidii* em todos os tempos analisados: 0 h.a.i, 144 h.a.i e 336 h.a.i. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

Foram identificadas 58 proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância associadas à *S. jambos* durante o período da infecção causada por *A. psidii* (GM-J1). Dentre as 58 proteínas, algumas foram identificadas como importantes no processo de defesa da planta contra o ataque do patógeno: *photosystem II protein D2* e *photosystem I reaction center subunit III* (0 h.a.i); *pathogenesis-related protein STH-2-like* e *translationally-controlled tumor protein homolog* (144 h.a.i); *major allergen Pru ar 1* e *plastocyanin* (336 h.a.i) (Tabela 2.2). As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas às 0 h.a.i possuem função relacionada à fotossíntese, essencial para a obtenção de energia para o desenvolvimento em vegetais. Enquanto as proteínas encontradas às 144 e 336 h.a.i tem suas funções associadas ao processo de defesa da planta para combater o ataque promovido pelo fungo *A. psidii*.

Tabela 2.2. Proteínas que mais contribuíram para a diferença de abundância durante o processo de infecção identificadas em plantas de *S. jambos* inoculadas com *A. psidii* entre zero e 336 horas após a inoculação.

Tempo	ID de acesso ¹	Nome da proteína ²
	XP_010030574.1	<i>histone H4</i>
	XP_010059618.1	<i>uncharacterized protein LOC104447596</i>
	XP_010035847.1	<i>ketol-acid reductoisomerase</i>
	XP_010033105.1	<i>ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase</i>
	XP_010031619.1	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase</i>
	XP_010034044.1	<i>heat shock 70 kDa protein</i>
	XP_010030975.1	<i>heat shock cognate 70 kDa protein 2</i>
	XP_010028648.1	<i>fructose-bisphosphate aldolase 1</i>
	XP_010060685.2	<i>protein DJ-1 homolog B isoform X3</i>
	XP_010056299.1	<i>proteasome subunit beta type-1</i>
	XP_010063760.1	<i>proteasome subunit alpha type-2-A</i>
	XP_010025193.1	<i>linoleate 9S-lipoxygenase 5 isoform X2</i>
	YP_003933949.1	<i>ATP synthase CF1 alpha subunit</i>
0 h.a. i	NP_001289638.1	<i>tubulin beta-9 chain</i>
	XP_010046715.1	<i>ubiquitin</i>
	XP_010026741.1	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
	XP_010025116.1	<i>bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase</i>
	XP_010033372.1	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
	XP_010035276.1	<i>photosystem I reaction center subunit III</i>
	XP_010033655.1	<i>proteasome subunit alpha type-5</i>
	XP_010036726.1	<i>fructose-bisphosphate aldolase 6</i>
	XP_010031259.1	<i>sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase</i>
	XP_010025020.1	<i>GDP-mannose 3, 5-epimerase 2</i>
	XP_010044133.1	<i>fructose-bisphosphate aldolase 3</i>
	XP_010052052.1	<i>peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1</i>
	YP_003933957.1	<i>photosystem II protein D2</i>
	XP_010060861.1	<i>phosphoglycerate kinase</i>

XP_018727988.1	<i>ribonucleases P/MRP protein subunit POP1-like</i>
XP_010062999.1	<i>polyadenylate-binding protein RBP45C</i>
XP_010025117.1	<i>bifunctional 3-dehydroquininate dehydratase/shikimate dehydrogenase</i>
XP_010036728.1	<i>pyruvate kinase 1</i>
XP_010037503.1	<i>elongation factor Tu</i>
XP_018715325.1	<i>pyruvate kinase 2</i>
XP_010053906.1	<i>transketolase</i>
XP_010053907.1	<i>transketolase</i>
XP_010069197.1	<i>chaperone protein ClpD</i>
XP_010023772.1	<i>chaperonin CPN60-2</i>
XP_010030182.1	<i>stromal 70 kDa heat shock-related protein</i>
XP_010069812.1	<i>endoplasmin homolog</i>
XP_010063599.1	<i>heat shock 70 kDa protein-like</i>
XP_010067511.1	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
XP_010024705.1	<i>translationally-controlled tumor protein homolog</i>
XP_010044150.1	<i>ATP synthase subunit beta</i>
NP_001289660.1	<i>tubulin alpha chain-like</i>
XP_010068989.1	<i>peroxiredoxin-2E-1</i>
XP_010052791.1	<i>nucleoside diphosphate kinase 1</i>
XP_010023669.1	<i>pathogenesis-related protein STH-2-like</i>
XP_010024740.1	<i>major allergen Pru ar 1</i>
XP_010043318.1	<i>photosystem I reaction center subunit IV</i>
XP_010030127.1	<i>ferredoxin</i>
XP_010063287.1	<i>plastocyanin</i>
XP_010024751.1	<i>Bet_v_1 domain-containing protein</i>
XP_010064214.1	<i>major allergen Pru av 2</i>
XP_010032227.1	<i>elongation factor 1-alpha</i>
XP_010063836.1	<i>peroxidase I2</i>
--	<i>Not found</i>
XP_010047845.1	<i>heat shock cognate protein 80-like</i>
XP_010037962.1	<i>60S ribosomal protein L12-1</i>

144 h.a. i

336 h.a. i

¹ ID de acesso é a identificação de acesso da proteína no banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

² Nome da proteína de acordo com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

DISCUSSÃO

As plantas possuem um extenso repertório de respostas pelas quais são capazes de localizar, inibir e isolar infecções. A compreensão de como as plantas identificam um agente estranho como um patógeno e como eles interagem com uns aos outros, é benéfico para a realização do melhoramento genético da cultura bem como elaborar melhores estratégias de controle do patógeno. Por essas razões, muitos esforços têm sido investidos no sentido de compreender os mecanismos de resistência a doenças em plantas (Li et al., 2013; Soliman et al., 2020). As respostas de defesa em plantas ao ataque de patógenos muitas vezes começam com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios (PAMPs ou MAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) localizado na superfície da célula vegetal (Göhre; Robatzek, 2008; Bigeard; Colcombet; Hirt, 2015).

Por outro lado, as proteínas efectoras secretadas por fungos durante a infecção têm como alvo diferentes processos celulares para facilitar a colonização do tecido que facilitam a invasão do tecido (Toruño; Stergiopoulos; Coaker, 2016). Moléculas de sinalização produzidas por patógenos também inibem as respostas de defesa do hospedeiro, alterando a fisiologia para inativar as ações do hospedeiro acerca dos processos que interrompem as funções do patógeno durante o período de infecção (Selin et al., 2016). E assim se tem uma constante batalha entre planta e patógeno durante o processo de infecção.

O objetivo comum dos fungos biotróficos (invadir o tecido hospedeiro causando danos mínimos às células vegetais) é realizado de várias maneiras. Estruturas de infecção iniciais não parecem ser fundamentalmente diferentes daquelas encontradas em fungos necrotróficos, mas elas geralmente mostram uma especialização mais funcional, como a capacidade de reconhecer características específicas da superfície do hospedeiro (por exemplo, o tamanho das células-guarda dos estômatos no caso de fungos causadores de ferrugem). Dentro do tecido do hospedeiro, as hifas do fungo biotrófico não provocam a morte da célula hospedeira (Mendgen; Hahn, 2002). Como isso ocorre ainda não está totalmente esclarecido, mas este entendimento, bem como a quantificação do patógeno durante estes estágios é de grande importância para o melhor entendimento do desenvolvimento da doença.

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, relacionados à detecção e quantificação de GM-J1 em folhas de *S. jambos* durante o processo de infecção, foi observado que o patógeno teve sua detecção aumentada à medida que o período de infecção se estendeu (0 h.a.i - 12,4876 pg; 72 h.a.i - 18,1148 pg; 144 h.a.i - 1586,5252 pg e 336 h.a.i - 42405,5027 pg de DNA). Bini et al. (2018), em um estudo semelhante, a partir da detecção e quantificação de *A. psidii* (MF-01) durante o processo de infecção em *E. grandis*, observou que a detecção do patógeno por

qPCR aumentou durante o tempo de interação com a planta. Entre às 0 h.a.i (10.801 pg de DNA) e 72 h.a.i (22.747 pg de DNA), os resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho. Às 240 h.a.i, a quantificação aumentou até 1382.672 pg de DNA. Diante dos resultados apresentados, até as 72 h.a.i, o comportamento tanto do MF-01 quanto do GM-J1 quanto à velocidade de infecção são semelhantes. No entanto, a partir das 144 h.a.i, o fungo GM-J1 se torna bem mais agressivo em jambo, podendo estar associado à uma maior suscetibilidade do jambo à ferrugem, quando comparado a plantas de eucalipto. O comportamento do fungo, em relação aos tempos avaliados, foi de grande importância para a escolha dos tempos de coleta de material para o estudo proteômico da interação *A. psidii* – *S. jambos*.

Diversos estudos vêm sendo realizados para obter um melhor conhecimento sobre a interação *A. psidii* – *S. jambos*, como estudo do perfil transcricional de genes candidatos a efetores (Lopes, 2017), metabolômica e identificação de metabólito lipídico que favorece a germinação de urediniósporos de *P. psidii* (Tessmann; Dianese, 2002), constatação da reprodução sexual entre populações do patógeno para uma melhor adaptação às mudanças no ambiente (McTaggart et al., 2020), evidências sobre o complemento do ciclo sexual de *A. psidii* no mesmo hospedeiro (McTaggart et al., 2018). No entanto, um estudo proteômico durante o processo de infecção de *A. psidii* em *S. jambos* é inédito.

A partir do estudo proteômico durante o processo de infecção de *A. psidii* (GM-J1) em plantas suscetíveis de *S. jambos* realizado neste trabalho, foi possível observar diversas proteínas relacionadas à patogenicidade por parte do fungo, e em contrapartida, várias outras proteínas responsáveis pela defesa da planta em resposta ao processo infeccioso. No total foram identificadas 118 proteínas (zero, 144 e 336 h.a.i) associadas à *S. jambos* e 11 proteínas (zero, 144 e 336 h.a.i) relacionadas à *A. psidii*. Essa menor quantidade de proteínas identificadas pode ser devido ao equipamento utilizado na análise (Q-Tof), devido a diferenças na resolução absoluta do instrumento e detecção de íons, bem como diferenças em eficiência de dessolvatação (Rose et al., 2012). Em contrapartida, Bindschedler et al. (2009) inocularam o fungo biotrófico *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* em plantas suscetíveis de cevada. A partir de uma análise proteômica, analisada por LC-MS / MS acoplada a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap, identificaram 441 proteínas de esporos não germinados 7 dias após a inoculação (d.a.i); 775 proteínas de hifas (5 d.a.i) e 47 proteínas de haustório (7-10 d.a.i). Sendo possível observar que o tipo de equipamento utilizado, como o analisador de massa Orbitrap, tem um forte impacto em estudos estruturais e bioquímicos, em sistemas biologia e no estudo de redes de interação de proteínas. A alta sensibilidade e resolução de massa alcançável permitem mais

profundidade e informações mais detalhadas a serem obtidas de acordo com o equipamento utilizado (Rose et al., 2012).

Em relação a categorização funcional Quecine et al. (2016) observaram uma maior abundância de GO termos. me MF-01 e GM-01 Avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos usando plantas para crescimento e purificação dos isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontrado 441.

Dentre as proteínas identificadas e associadas à GM-J1 durante o processo de infecção em *S. jambos*, algumas podem possuir grande importância para um melhor entendimento da interação patógeno-planta: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (diferencialmente abundante às 0 h.a.i), *glycine dehydrogenase* (diferencialmente abundante às 144 h.a.i) e *heat shock protein* (diferencialmente abundante às 144 e 366 h.a.i).

Diversos estudos vêm sendo realizados visando a identificação de proteínas relacionadas ao processo de germinação de esporos (Sharma et al., 2016; Luo et al., 2020), crescimento micelial de fungos (Lee et al., 2017; El-Sharkawy; Alshora, 2020; Wang et al., 2020) e durante o desenvolvimento da doença (Quoc; Bao, 2017; Paccanaro et al., 2017) para auxiliar no melhor conhecimento sobre as etapas do processo de infecção durante a interação patógeno-planta.

A *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) é uma enzima glicolítica essencial, também conhecida por sua versatilidade de funções dentro das células. GAPDH é amplamente explorada em diversos organismos e demonstrou desempenhar papéis vitais no metabolismo eucariótico (Seidler, 2013), auxiliando proteínas em processos regulatórios (Kornberg et al., 2010), relacionado ao ciclo celular e apoptose (Tarze et al., 2007) e formando complexos glicolíticos multiproteicos com a *heat shock protein* (Liu et al., 2009).

A proteína *glycine dehydrogenase* (GDh) faz parte de um complexo mitocondrial de glicina descarboxilase que tem se mostrado importante para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em glicina como única fonte de nitrogênio (Sinclair; Dawes, 1995).

Hernandez et al. (2011) desenvolveram um estudo relacionado à análise de expressão de genes considerados como cruciais para o sucesso do processo de infecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em humanos: a germinação do fungo e a transição de conídio para micélio. Neste estudo os autores observaram que a expressão do gene relacionado à proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* foi aumentado, indicando que está fortemente relacionado ao processo de germinação do fungo. Em relação à transição de conídio para micélio, o gene associado à proteína *glycine dehydrogenase* também teve uma expressão aumentada, indicando a importância nesta fase de desenvolvimento do patógeno *P. brasiliensis* em células humanas. Neste trabalho, a proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* foi encontrada às 0 h.a.i em urediniósporos GM-J1 em plantas de *S. jambos*. Podendo indicar que a presença dessa importante proteína auxilia no processo de germinação dos urediniósporos em plantas suscetíveis de *S. jambos*. Já proteína *glycine dehydrogenase* foi diferencialmente abundante às 144 h.a.i, período do processo de infecção mais avançado, podendo estar associado ao crescimento micelial do fungo durante a colonização do hospedeiro.

Heat shock proteins (Hsp) ou chaperonas são proteínas onipresentes e citoprotetoras, que são essenciais para o dobramento de proteínas em células procarióticas e eucarióticas (Hartl; Hayer-Hartl, 2002). A família de proteínas Hsp60, são encontradas na mitocôndria da célula, e são expressas, principalmente, sob condições estressantes (Bukal; Horwich, 1998; Pfister et al., 2005).

Fernandes et al. (2020) investigaram a expressão relativa de mRNA para *Heat shock protein 60* (Hsp60) em *Paracoccidioides brasiliensis* cultivado *in vitro* sob condições normalmente encontradas em humanos. As análises mostraram um aumento substancial nas quantidades relativas de mRNA de Hsp60, acompanhando o desenvolvimento do fungo. Com relação à localização celular, a análise por microscopia imunoeletrônica revelou que o Hsp60 está presente dentro da parede celular. Essas observações sugerem que essa proteína pode estar envolvida na manutenção da integridade da parede celular e na interação com o hospedeiro para colonização, infecção e patogênese. Neste trabalho a *Heat shock protein 60* foi diferencialmente abundante às 144 h.a.i e também às 336 h.a.i, podendo ser uma das proteínas associadas à patogenicidade e uma das responsáveis pela evolução da doença em plantas de *S. jambos*.

A categorização funcional de proteínas provenientes de *S. jambos* apontam uma maior quantidade de proteínas relacionadas ao GO termos.... funcional de Quecine et al. (2016) observaram uma maior abundância de GO termos. me MF-01 e GM-01 Avaliamos duas populações da mesma espécie de fungo e observamos um grande número de proteínas cujos níveis mudaram entre as amostras, bem como a presença de proteínas únicas em ambas as

amostras. Optamos por realizar a análise de proteínas da população de fungos com base no fato de que o *P. psidii* tem um estilo de vida biotrófico. Não há relato de seu crescimento e multiplicação em meios sintéticos. Sendo incapaz de crescer fora do hospedeiro, é difícil caracterizar o proteoma de outra estrutura fúngica. Portanto, é trabalhoso produzir esporos usando plantas para crescimento e purificação dos isolados. Durante este processo, a seleção artificial pode ocorrer potencialmente produzindo um patógeno mais agressivo dependendo do hospedeiro. Alguns estudos, que utilizaram diferentes métodos e equipamentos, encontraram maior número de proteínas do que os 340 descritos para *P. psidii*. Por exemplo, Bindschedler et al. encontrado 441.

A partir da análise proteômica das proteínas associadas à *S. jambos* durante o processo de infecção causado por *A. psidii* (GM-J1), diversas proteínas relacionadas à defesa da planta foram identificadas. Como destaque podemos citar as proteínas *photosystem I reaction center subunit III* e *photosystem II protein D2* (0 h.a.i); *translationally-controlled tumor protein homolog* e *pathogenesis-related protein STH-2-like* (144 h.a.i) e *major allergen Pru ar 1* e *plastocyanin* (336 h.a.i). Sendo estas proteínas relacionadas ao metabolismo energético e à defesa da planta visando o combate ao patógeno.

Há muito se sabe que a fotossíntese é o principal processo na Terra que converte a energia luminosa do sol em energia química (Rabinowitch, 1956). Os processos primários da fotossíntese em plantas estão localizados em organelas especiais, os cloroplastos, e a clorofila desempenha um papel fundamental neste processo (Kamen, 2013). Apesar de os conhecimentos acerca das biomoléculas envolvidas neste processo permanecerem por muito tempo um mistério, uma evolução nas pesquisas foi alcançada em meados do século passado, quando o conceito de dois fotossistemas foi introduzido e confirmado por evidências experimentais (Fromme; Mathis, 2003). Um estudo desenvolvido por Wang (2007), investigando a expressão gênica do complexo de coleta de luz II (*LhcII*) associados às proteínas *photosystem I reaction center subunit III* e *photosystem II protein* na macroalga marinha *Ulva fasciata*, concluiu que são proteínas importantes na capacidade fotossintética para a obtenção de energia. Essas mesmas proteínas foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância às 0 h.a.i, podendo também comprovar a presença dessas proteínas associadas ao processo fotossintético em plantas de *S. jambos*.

A expressão dos genes de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) é ativada por uma série de estresses bióticos ou abióticos, incluindo infecção por patógenos (Van Loon; Rep; Pieterse, 2006). As funções enzimáticas de algumas dessas proteínas PR indicam seu papel na defesa da planta contra o ataque de patógenos. No entanto, o acúmulo de PRs não é um pré-

requisito para a indução de resistência, uma vez que eles fazem apenas uma pequena contribuição para o sistema de defesa da planta (Van Loon; Rep; Pieterse, 2006). Neste sentido, Dahal et al. (2009) realizaram um estudo proteômico durante o processo de infecção de *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomate suscetíveis e resistentes. Observaram a presença da proteína PR *pathogenesis-related protein STH-2-like* em plantas suscetíveis, e concluíram que é uma proteína que ajuda o sistema da planta no combate ao patógeno, mas não é uma proteína relacionada à indução de resistência do vegetal ao agente causal da doença. Essa mesma proteína foi diferencialmente abundante às 144 h.a.i no presente trabalho. A proteína *major allergen Pru ar 1* identificada às 336 h.a.i em plantas de *S. jambos* também é classificada como uma PR, e possui atividade antifúngica participando da defesa da planta contra invasão de patógenos (Zhang et al., 2020). Podendo indicar que essas proteínas PR podem ter importância no combate ao fungo invasor também em *S. jambos*

A *translationally-controlled tumor protein homolog* (TCTP) é uma proteína altamente conservada, e amplamente expressa em todos os organismos eucarióticos (Bommer e Thiele, 2004). A TCTP pode estar envolvida em uma série de processos biológicos celulares básicos, como promoção do crescimento e desenvolvimento, defesa celular em resposta a estresses biológicos (Bommer; Telerman, 2020), como tolerância à seca (Kim et al, 2012), tolerância à salinidade e altas temperaturas (Qin et al., 2011; De Carvalho et al, 2017). A *translationally-controlled tumor protein homolog* também foi identificada às 144 h.a.i em plantas de *S. jambos* infectadas com GM-J1, no entanto ainda não está totalmente esclarecida a função desta proteína em relação ao processo de defesa celular devido à ação de agentes bióticos.

A proteína *plastocyanin* funciona como um componente-chave do transporte fotossintético de elétrons (TFE), onde a concentração de plastocianinas vegetais pode afetar a atividade de transporte de elétrons (Schöttler; Kirchhoff; Weis, 2004). Um estudo desenvolvido por Zhou et al. (2018) revelou um novo papel da *plastocyanin* vegetal na proteção contra o estresse oxidativo a partir da análise de expressão do gene (*SsPETE2*) associado à proteína *plastocyanin* em plantas de *Suaeda salsa* quando submetidas ao estresse salino. Segundo Pesaresi et al. (2009) a *plastocyanin* pode ter influência na fotossíntese, com base na sua abundância em células vegetais. A *plastocyanin* também foi encontrada neste trabalho às 336 h.a.i, podendo estar relacionada à defesa de *S. jambos* em decorrência ao estresse causado pela presença de do fungo GM-J1. Podendo também estar agindo no processo da fotossíntese, tentando compensar a perda na área fotossintética da folha causada pela formação das estruturas de infecção de *A. psidii*.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho foi possível observar que, a partir do estudo proteômico durante o processo de infecção de *A. psidii* (GM-J1) em plantas de *S. jambos*

suscetíveis, esta pesquisa contribuiu um pouco mais para um melhor entendimento acerca da interação patógeno-planta durante o desenvolvimento da doença.

REFERÊNCIAS

- ABBAI, Ragavendran et al. Proteomic analysis of compatible and incompatible interactions of wheat with *Puccinia triticina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 96, p. 36-46, 2016.
- AIME, M. Catherine et al. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. **In: Advances in genetics**. Academic Press, 2017. p. 267-307.
- AKARACHANTACHOTE, Noppamas; CHADCHAM, Seree; SAITHANU, Kidakan. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v. 94, n. 3, p. 307-322, 2014.
- ALFENAS, A. C. et al. Heteropyxis natalensis, a new host of *Puccinia psidii* rust. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 285-286, 2005.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ASHBURNER, Michael et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
- AVILA-PÉÑA, D. et al. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 380-385, 2007.
- BERTHON, Katherine A. et al. Endangered species face an extra threat: susceptibility to the invasive pathogen *Austropuccinia psidii* (myrtle rust) in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 4, p. 385-393, 2019.
- BIGEARD, Jean; COLCOMBET, Jean; HIRT, Heribert. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, v. 8, n. 4, p. 521-539, 2015.
- BINDSCHEDLER, Laurence V. et al. In planta proteomics and proteogenomics of the biotrophic barley fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 10, p. 2368-2381, 2009.
- BINI, Andressa Peres et al. Development of a quantitative real-time PCR assay using SYBR Green for early detection and quantification of *Austropuccinia psidii* in *Eucalyptus grandis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 3, p. 735-746, 2018.
- BOMMER, Ulrich-Axel; THIELE, Bernd-Joachim. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 3, p. 379-385, 2004.
- BOMMER, Ulrich-Axel; TELERMAN, Adam. Dysregulation of TCTP in Biological Processes and Diseases. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1632, 2020.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUKAU, Bernd; HORWICH, Arthur L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, 1998.
- BUSHNELL, William (Ed.). **The cereal rusts: origins, specificity, structure, and physiology**. Elsevier, 2012.
- CONESA, Ana et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- COOK, David E.; MESARICH, Carl H.; THOMMA, Bart PHJ. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 541-563, 2015.
- COUTINHO, T. A. et al. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.
- DAHAL, Diwakar et al. Pathogenesis and stress related, as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 838-846, 2009.
- DE CARVALHO, Márcio et al. Impacts of the overexpression of a tomato translationally controlled tumor protein (TCTP) in tobacco revealed by phenotypic and transcriptomic analysis. **Plant cell reports**, v. 36, n. 6, p. 887-900, 2017.
- DONATINI, Raquel S. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1a, p. 89-94, 2009.
- DRACATOS, Peter Michael et al. Exploring and exploiting the boundaries of host specificity using the cereal rust and mildew models. **New Phytologist**, v. 218, n. 2, p. 453-462, 2018.

- EL-SHARKAWY, Reyad; ALSHORA, Hamed Mohamed. Biocontrol of wilt-inducing *Fusarium oxysporum* by aqueous leaf extract from Egyptian *Ammi majus* and *Ammi visnaga*. **Egyptian Journal of Botany**, v. 60, n. 2, p. 423-435, 2020.
- FERNANDES, Fabrício Freitas et al. Expression of Hsp60 and its cell location in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.
- FROMME, Petra; MATHIS, Paul. Unraveling the Photosystem, I reaction center: a history, or the sum of many efforts. **Photosynthesis Research**, v. 80, n. 1-3, p. 109-124, 2004.
- GAVILLÁN-SUÁREZ, Jannette et al. Chemical profile and in vivo hypoglycemic effects of *Syzygium jambos*, *Costus speciosus* and *Tapeinochilos ananassae* plant extracts used as diabetes adjuvants in Puerto Rico. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 244, 2015.
- GIBLIN, F.; CARNEGIE, A. J. Puccinia psidii (myrtle rust) - global host list. **Australian National Botanic Gardens Centre for Australian National Biodiversity Research**. (18 October 2016), 2014.
- GLAZEBROOK, Jane. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 205-227, 2005.
- GLEN, M. et al. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy—a review. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel; PRATS, Elena; JORRÍN-NOVO, Jesús V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.
- GÖHRE, Vera; ROBATZEK, Silke. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual review of phytopathology**, v. 46, p. 189-215, 2008.
- GRATTAPAGLIA, Dario et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: Eucalyptus as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.
- HAHN, Matthias. The rust fungi. **In: Fungal pathology**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 267-306.
- HARTL, F. Ulrich; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, 2002.
- HERNANDEZ, O. et al. Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Yeast**, v. 28, n. 11, p. 771-781, 2011.
- HOSSAIN, Hemayet et al. HPLC profiling, antioxidant and in vivo anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Syzygium jambos* available in Bangladesh. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 191, 2016.
- ISHIHAMA, Yasushi et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 1265-1272, 2005.
- JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, v. 4, n. 8, p. 475-487, 1944.
- JUNGHANS, D. T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major Gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 1, p. 175-180, 2003.
- KAMEN, Martin D. **Primary processes in photosynthesis**. Elsevier, 2013.
- KEMEN, Ariane C.; AGLER, Matthew T.; KEMEN, Eric. Host–microbe and microbe–microbe interactions in the evolution of obligate plant parasitism. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1207-1228, 2015.
- KIM, Yong-Min et al. Overexpression of Arabidopsis translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. **Molecules and cells**, v. 33, n. 6, p. 617-626, 2012.
- KORNBERG, Michael D. et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nature cell biology**, v. 12, n. 11, p. 1094-1100, 2010.
- KUIATE, Jules-Roger et al. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 2, p. 149-152, 2007.
- LEE, Jangwoo et al. Use of swine wastewater as alternative substrate for mycelial bioconversion of white rot Fungi. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 844-859, 2017.
- LEITE, Thiago Falda. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- LI, Yan et al. Mechanism of plant–microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 83, p. 51-58, 2013.
- LIM, Tong Kwee. **Edible medicinal and non-medicinal plants**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2012.
- LIU, Kun et al. Two-dimensional blue native/SDS-PAGE analysis reveals heat shock protein chaperone machinery involved in hepatitis B virus production in HepG2. 2.15 cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 495-505, 2009.
- LOPES, Mariana da Silva. **Identificação *in silico* e perfil transcricional de genes candidatos a efetores de *Austropuccinia psidii***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 71 p. 2017.

- LUO, Feifei et al. The Intermediates in Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Are Indispensable for Conidial Germination of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 20, 2020.
- MANDELIC, Stanislav et al. Comparison of mycelial proteomes of two *Verticillium albo-atrum* pathotypes from hop. **European journal of plant pathology**, v. 125, n. 1, p. 159-171, 2009.
- MAIER, W. et al. A new *Eucalyptus* rust from Mozambique and South Africa. **In: Proceedings of the 4th International Rusts of Forest Trees Conference**, Florence, Italy, 3–6 May 2010. 2010.
- M'BAREK, Sarrah Ben et al. Proteome catalog of *Zymoseptoria tritici* captured during pathogenesis in wheat. **Fungal Genetics and Biology**, v. 79, p. 42-53, 2015.
- MCTAGGART, A. R. et al. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. **Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 729-734, 2017.
- MCTAGGART, Alistair R. et al. Chromium sequencing: the doors open for genomics of obligate plant pathogens. **Biotechniques**, v. 65, n. 5, p. 253-257, 2018.
- MCTAGGART, Alistair R. et al. Sexual reproduction in populations of *Austropuccinia psidii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 537-545, 2020.
- MENDGEN, Kurt; HAHN, Matthias. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in plant science**, v. 7, n. 8, p. 352-356, 2002.
- MORIN, Louise; TALBOT, Mark J.; GLEN, Morag. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. **Fungal biology**, v. 118, n. 2, p. 253-263, 2014.
- MOHAMED, Saeed S. et al. *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae), a new record introduced to the flora of Yemen. **J Biol Earth Sci**, v. 4, n. 1, p. B52-B56, 2014.
- MOHANTY, S.; COCK, I. E. Bioactivity of *Syzygium jambos* methanolic extracts: Antibacterial activity and toxicity. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 1, p. 4, 2010.
- MYBURG, Alexander A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.
- NAWWAR, M. A. et al. Phenolic profiling of an extract from *Eugenia jambos* L. (Alston)-the structure of three flavonoid glycosides—antioxidant and cytotoxic activities. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 3, p. 162-168, 2016.
- NISHIMURA, Marc T.; DANGL, Jeffery L. *Arabidopsis* and the plant immune system. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1053-1066, 2010.
- PACCANARO, Maria Chiara et al. Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 11, p. 886-895, 2017.
- PAPER, Janet M. et al. Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**, v. 7, n. 17, p. 3171-3183, 2007.
- PEL, Michiel JC; PIETERSE, Corné MJ. Microbial recognition and evasion of host immunity. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1237-1248, 2013.
- PERFECT, Sarah E.; GREEN, Jonathan R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-108, 2001.
- PESARESI, Paolo et al. Mutants, overexpressors, and interactors of *Arabidopsis plastocyanin* isoforms: revised roles of plastocyanin in photosynthetic electron flow and thylakoid redox state. **Molecular plant**, v. 2, n. 2, p. 236-248, 2009.
- PFISTER, Gerald et al. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. **Journal of cell science**, v. 118, n. 8, p. 1587-1594, 2005.
- PITARCH, Aida et al. Analysis of the *Candida albicans* proteome: I. strategies and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 787, n. 1, p. 101-128, 2003.
- QIN, Xiaobo et al. Molecular cloning, characterization and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Jatropha curcas* L. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 5, p. 3107-3112, 2011.
- QUECINE, Maria Carolina et al. Label-free quantitative proteomic analysis of *Puccinia psidii* uredospores reveals differences of fungal populations infecting eucalyptus and guava. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. e0145343, 2016.
- QUOC, Nguyen B.; BAO CHAU, Nguyen Ngoc. The role of cell wall degrading enzymes in pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 1019-1034, 2017.
- RABINOWITZ, Eugene I. et al. Photosynthesis and related processes. Vol. II. Part 2. **Photosynthesis and related processes. Vol. II. Part 2.**, 1956.
- RAJKUMARI, J. et al. Anti-quorum sensing activity of *Syzygium jambos* (L.) Alston against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive components. **South African Journal of Botany**, v. 118, p. 151-157, 2018.

- RAPPSILBER, Juri; MANN, Matthias; ISHIHAMA, Yasushi. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896, 2007.
- ROSE, Rebecca J. et al. High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies. **Nature methods**, v. 9, n. 11, p. 1084-1086, 2012.
- SANTOS, Isaneli Batista dos. **Deciphering the role of early molecular interactions between *Eucalyptus* spp. x *Austropuccinia psidii* and its pathogenesis**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019.
- SCHÖTTLER, Mark Aurel; KIRCHHOFF, Helmut; WEIS, Engelbert. The role of plastocyanin in the adjustment of the photosynthetic electron transport to the carbon metabolism in tobacco. **Plant Physiology**, v. 136, n. 4, p. 4265-4274, 2004.
- SEIDLER, Norbert W. GAPDH and intermediary metabolism. In: **GAPDH: Biological Properties and Diversity**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 37-59.
- SELIN, Carrie et al. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 600, 2016.
- SELVAM, N. Thamizh et al. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Syzygium jambos* (Linn.) leaf against paracetamol intoxicated Wistar albino rats. **Ayu**, v. 34, n. 3, p. 305, 2013.
- SHARMA, Richa et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 292, 2013.
- SHARMA, Mamta et al. Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. **Scientific reports**, v. 6, p. 37353, 2016.
- SHEVCHENKO, Andrej et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- SINCLAIR, David A.; DAWES, Ian W. Genetics of the synthesis of serine from glycine and the utilization of glycine as sole nitrogen source by *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 140, n. 4, p. 1213-1222, 1995.
- SOLIMAN, Sameh SM et al. Critical discovery and synthesis of novel antibacterial and resistance-modifying agents inspired by plant phytochemical defense mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109318, 2020.
- STEWART, J. E. et al. Genetic diversity of the myrtle rust pathogen (*Austropuccinia psidii*) in the Americas and Hawaii: Global implications for invasive threat assessments. **Forest Pathology**, v. 48, n. 1, p. e12378, 2018.
- TAMIELLO, Camila Silva et al. Arabinogalactan from edible jambo fruit induces different responses on cytokine secretion by THP-1 macrophages in the absence and presence of proinflammatory stimulus. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 35-41, 2017.
- TAMIELLO, Camila Silva et al. Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1414-1421, 2018.
- TARZE, A. et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, v. 26, n. 18, p. 2606-2620, 2007.
- TESSMANN, D. J. et al. Epidemiology of a Neotropical rust (*Puccinia psidii*): periodical analysis of the temporal progress in a perennial host (*Syzygium jambos*). **Plant Pathology**, v. 50, n. 6, p. 725-731, 2001.
- TESSMANN, DAURI J.; DIANESE, JOSÉ C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 538-542, 2002.
- TORUÑO, Tania Y.; STERGIPOULOS, Ioannis; COAKER, Gitta. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 419-441, 2016.
- TRAPNELL, Cole; PACHTER, Lior; SALZBERG, Steven L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.
- VAN LOON, Leendert C.; REP, Martijn; PIETERSE, Corné MJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- WANG, Liuqing et al. Transcriptomic Insights into the Antifungal Effects of Magnolol on the Growth and Mycotoxin Production of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 12, n. 10, p. 665, 2020.
- WANG, Shin-Mei. Studies on the gene expression of chlorophyll a/b-binding protein (LhcII) and photosystem I subunit III (psaF) in *Ulva fasciata*. 2007.
- WINTER, G. Rabenhorstii Fungi europaei et extraeuropaei. **Cent. XXXI et XXXII. Hedwigia**, v. 23, p. 163-175, 1885.
- ZHANG, Xiaoyun et al. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 163, p. 111146, 2020.
- ZHOU, Xin-Tong et al. Ectopic expression of SsPETE2, a plastocyanin from *Suaeda salsa*, improves plant tolerance to oxidative stress. **Plant science**, v. 268, p. 1-10, 2018.

4. ESTUDOS ÔMICOS DA INTERAÇÃO *Eucalyptus grandis* x *Austropuccinia psidii*

Resumo

Austropuccinia psidii causa a doença comumente conhecida como ferrugem das Mirtáceas, uma doença associada a um fungo biotrófico obrigatório pertencente ao filo Basidiomycota que é altamente diverso. Em contraste com a maioria das outras ferrugens, a ferrugem das Mirtáceas tem o potencial de infectar centenas de espécies diferentes, aumentando as consequências relacionadas à infecção. O *Eucalyptus grandis* é uma das espécies pertencente às Mirtáceas que é bastante afetada pela doença, principalmente devido ao seu alto valor econômico e sua variável grau de suscetibilidade. A doença pode diminuir consideravelmente a produtividade da eucaliptocultura devido à sua severidade. Diante disso, estudos ômicos se tornam importantes técnicas para aplicar durante o processo de infecção entre *A. psidii* - *E. grandis*, visando avaliar quais os compostos estão presentes nessa complexa interação planta-patógeno. Assim, foi realizado a análise metabolômica por meio de Cromatografia Líquida (LC-MS; nos modos negativo e positivo de operação) e Cromatografia Gasosa (GC-MS), aliados a uma análise proteômica realizada com o auxílio de espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplados a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY. Estas análises foram realizadas durante o início e final do processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis*, sendo coletado material vegetal inoculado com o patógeno às 0 e 144 horas após a inoculação (h.a.i.). Como resultados foram identificadas 2299 proteínas totais durante a interação planta patógeno. Onde 143 estão associadas a funções de *A. psidii* e 2156 relacionadas à *E. grandis*. Dentre as proteínas associadas à *A. psidii* destacam-se: *Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein* (0 h.a.i) – associada à formação de apressório; *transaldolase* (144 h.a.i) e *adenosylhomocysteinase* (144 h.a.i) – estas associadas ao metabolismo, patogenicidade e colonização no hospedeiro. Em relação as proteínas identificadas em *E. grandis*, as proteínas que possuem funções interessantes são: *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* e *rubisco accumulation factor 1* identificadas às 0 h.a.i (participando na produção de energia – fotossíntese); e as proteínas *malate dehydrogenase*, *major allergen Pru av 1-like*, *abscisic stress ripening protein*, *actin-7*, *V-type proton ATPase*, *proteasome subunit alpha* e *isoflavone reductase-like* identificadas às 144 h.a.i (com funções relacionada à defesa da planta). De acordo com os resultados obtidos a partir das análises metabolômicas foi possível observar que 59 metabólitos foram identificados a partir de LC-MS (50 no modo positivo de operação - 16 às 0 h.a.i e 34 às 144 h.a.i; e 9 no modo negativo de operação - 4 às 0 h.a.i e 5 às 144 h.a.i) e 32 a partir do estudo de GC-MS (com 7 às 0 h.a.i; 24 às 144 h.a.i e 1 presente em ambos os tempos analisados). A partir da análise LC-MS (modo positivo) a *oleacin* (0 h.a.i) pode estar auxiliando o processo de germinação do fungo. Enquanto a *ceramide* (144 h.a.i) atua no processo de defesa da planta. Na LC-MS (modo negativo de operação) os metabólitos *6-Hydroxy-3,3',4',5,7,8-hexamethoxyflavone* (0 h.a.i) e *Chlorhexidine* (144 h.a.i) foram encontrados e podem participar do mecanismo de defesa da planta. Como metabólitos importantes na interação patógeno-planta provenientes de GC-MS, o ácido cinâmico (encontrado as 0 h.a.i) pode auxiliar o fungo no processo de entrada nos tecidos da planta; e os metabólitos Calistegina A3, ácido azeláico, ácido glicérico e piridoxamina (encontrados às 144 h.a.i) estão associados ao processo de defesa da planta. Diversas proteínas e metabólitos identificados no presente estudo possuem funções relacionadas ao sistema de defesa da planta ou ao mecanismo de ataque desenvolvido pelo fungo. Há uma correlação entre as proteínas XP_010028896.1 (*eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3*), XP_010056880.1 (*urease accessory protein G*), XP_010062321.1 (*expansin-A13*), XP_010066331.1 (*ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform XI*), XP_010044210.1 (*phosphoglucosyltransferase cytoplasmic isoform X2*), XP_010038186.1 (*glutathione S-transferase F13*) identificadas em *E. grandis* com a proteína evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (*ADP-ribosylation factor*) encontrada no estudo proteômico em *A. psidii*. Neste sentido, os resultados obtidos contribuem com o melhor entendimento à nível molecular da interação entre *A. psidii* e *E. grandis*, servindo como base para futuros estudos.

Palavras-chave: Metabolômica; proteômica; *shotgun*; ferrugem das Mirtáceas; interação planta-patógeno.

4. Omic studies of the interaction *Eucalyptus grandis* x *Austropuccinia psidii*

Abstract

Austropuccinia psidii causes the disease commonly known as Mirtacea rust, a disease associated with a mandatory biotrophic fungus belonging to the phylum Basidiomycota which is highly diverse. In contrast to most other rust, Mirtacea rust has the potential to infect hundreds of different species, increasing the consequences related to infection. *Eucalyptus grandis* is one of the species belonging to the Mirtaceae that is quite affected by the disease, mainly due to its high economic value and its variable degree of susceptibility. The disease can considerably decrease the productivity of *Eucalyptus* culture due to its severity. Therefore, omic studies become important techniques to apply during the infection process between *A. psidii* - *E. grandis*, aiming to evaluate which compounds are present in this complex plant-pathogen interaction. Thus, the metabolomic analysis was performed by means of Liquid Chromatography (LC-MS; in the negative and positive modes of operation) and Gas Chromatography (GC-MS), together with a proteomic analysis performed with the aid of an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer coupled to an LC NLC instrument (MS-MS / MS) by an EASY system. These analyzes were performed during the beginning and end of the *A. psidii* infection process in *E. grandis*, and plant material inoculated with the pathogen was collected at 0 and 144 hours after inoculation (h.a.i.). As a result, 2299 total proteins were identified during the plant pathogen interaction. Where 143 are associated with functions of *A. psidii* and 2156 related to *E. grandis*. Among the proteins associated with *A. psidii*, the following stand out: Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein (0 h.a.i) - associated with the formation of appressorium; transaldolase (144 h.a.i) and adenosylhomocysteinase (144 h.a.i) - these associated with metabolism, pathogenicity and colonization in the host. Regarding the proteins identified in *E. grandis*, the proteins that have interesting functions are: ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase activase and rubisco accumulation factor 1 identified at 0 h.a.i (participating in the production of energy - photosynthesis); and malate dehydrogenase proteins, major allergen Pru av 1-like, abscisic stress ripening protein, actin-7, V-type proton ATPase, proteasome subunit alpha and isoflavone reductase-like identified at 144 hai (with functions related to plant defense) . According to the results obtained from the metabolomic analyzes it was possible to observe that 59 metabolites were identified from LC-MS (50 in the positive mode of operation - 16 at 0 hai and 34 at 144 hai; and 9 in the negative mode of operation - 4 at 0 hai and 5 at 144 hai) and 32 from the study of GC-MS (with 7 at 0 hai; 24 at 144 hai and 1 present in both times analyzed). From the LC-MS analysis (positive mode), oleacin (0 h.a.i) may be helping the fungus germination process. While ceramide (144 h.a.i) acts in the plant defense process. In LC-MS (negative mode of operation) the metabolites 6-Hydroxy-3,3', 4', 5,7,8-hexamethoxyflavone (0 hai) and Chlorhexidine (144 hai) were found and may participate in the defense mechanism of the plant. As important metabolites in the pathogen-plant interaction from GC-MS, cinnamic acid (found at 0 h.a.i) can assist the fungus in the process of entering the plant tissues; and the metabolites Calistegine A3, azelaic acid, glycolic acid and pyridoxamine (found at 144 h.i.i) are associated with the plant's defense process. Several proteins and metabolites identified in the present study have functions related to the plant's defense system or the attack mechanism developed by the fungus. There is a correlation between the proteins XP_010028896.1 (eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3), XP_010056880.1 (urease accessory protein G), XP_010062321.1 (expansin-A13), XP_010066331.1 (ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform X1), XP_010044210.1 (cytoplasmic phosphoglucomutase isoform X2), XP_010038186.1 (glutathione S-transferase F13) identified in *E. grandis* with the protein evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (ADP-ribosyl factor) *A. psidii*. In this sense, the results obtained contribute to a better understanding at the molecular level of the interaction between *A. psidii* and *E. grandis*, serving as a basis for future studies.

Keywords: Metabolomics; proteomics; shotgun; rust of Mirtaceae; plant-pathogen interaction.

INTRODUÇÃO

Austropuccinia psidii (Basidiomycota; Pucciniales; Sphaerophragmiaceae) (Beenken, 2017) conhecido também como agente causal da doença ferrugem das Mirtáceas, é um fungo patogênico nativo da região central e América do Sul (Coutinho et al., 1998; Glen et al., 2007), que ataca uma ampla gama de espécies da família Myrtaceae (Carnegie; Lidbetter, 2012; Morin et al., 2012; Sandhu; Park, 2013; Giblin e Carnegie, 2014), causando danos sérios e perdas econômicas a plantas de *Eucalyptus grandis* (Pegg et al., 2017; Silva et al., 2017).

Respostas à infecção são espécie-específicas, com sintomas que variam de manchas roxas em espécies resistentes a características associadas à formação de urediniósporos amarelos que podem levar à distorção das folhas, desfolhamento, reprodução reduzida (por infecção de flores e frutos) e morte (Rayachhetry et al. 2001; Uchida; Zhong; Killgore, 2006; Carnegie et al. 2016).

Várias espécies do gênero *Eucalyptus* são suscetíveis à ferrugem das Mirtáceas, sendo considerada uma grande ameaça global para plantações exóticas e nativas (Carnegie; Pegg, 2018). No Brasil, a ferrugem é considerada uma das mais potencialmente nocivas doenças ao cultivo de eucalipto, a cultura mais importante para a celulose e indústria de papel do país (Junghans et al. 2003).

As espécies do gênero *Eucalyptus* se destacam por apresentar rápido crescimento, sobretudo nas condições tropicais, o que confere ao Brasil uma vantagem competitiva em relação a outros países concorrentes, devido às condições favoráveis de clima, solo, extensão territorial, mão de obra, infraestrutura e capacidade produtiva (Valverde et al., 2004). Estima-se que haja aproximadamente 20 milhões de ha de plantações de eucalipto em todo o mundo, onde aproximadamente 25% desse total está localizado no Brasil (Alvares et al., 2017). A plantação de culturas exóticas e geneticamente uniformes pode sofrer pressão de seleção e ser infectado por muitos patógenos endêmicos (Wingfield et al., 2015). O patógeno endêmico e cosmopolita mais importante relacionado às plantações de eucalipto é o fungo *Austropuccinia psidii* (Masson et al., 2013).

Para o melhor entendimento em nível molecular da interação planta-patógeno durante o processo de infecção, diversas técnicas vêm sendo aplicadas. Técnicas conhecidas como ômicas desenvolvidas em grande escala, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, são conhecidas por gerar conjuntos de dados massivos e complexos. Em combinação, essas abordagens têm o potencial de destrinchar de forma abrangente um sistema biológico e definir

como todos os seus componentes interagem dinamicamente (Bindschedler; Panstruga; Spanu, 2016).

A aplicação de técnicas proteômicas de alto rendimento é uma excelente abordagem para gerar grandes quantidades de informações biológicas e moleculares relacionado à biologia fúngica (Liang et al., 2010; González-Rodríguez et al., 2015). Assim, as análises proteômicas têm sido conduzidas para destrinchar processos associados à patogenicidade fúngica e as interações planta-patógeno (Liang et al., 2008; González-Fernández et al., 2014). As investigações à nível de proteoma normalmente envolvem eletroforese baseada na separação em gel ou abordagens de aplicação direta do extrato proteico em equipamentos (Gonzalez-Fernandez; Jorin-Novo, 2012). Especialmente as abordagens de *shotgun* com base em espectrometria de massa acopladas à cromatografia líquida (LC-MS / MS) têm se tornado cada vez mais populares para a caracterização de alto rendimento dos proteomas de diversos estudos relacionados à interação planta-patógeno (Sun et al., 2020; Rodríguez-Pires et al., 2020).

A metabolômica pode fornecer informações sobre o metabolismo da planta durante o desenvolvimento e em resposta a uma ampla gama de estímulos bióticos e abióticos, incluindo estresses relacionados à ataques de patógenos (López-Gresa et al., 2010; Pang et al., 2018).

Os potenciais *insights* integrativos incluem a reconstrução de redes metabólicas (Droste et al., 2011) e vias de sinalização complexas (Tierl et al., 2011). Conseqüentemente, esses métodos têm sido usados, individualmente ou em combinação, em inúmeras espécies e condições, incluindo diferentes tipos de fungos fitopatogênicos (Tan et al., 2009). O manuseio, integração e interpretação de dados de várias plataformas, a partir de estudos ômicos, permanece, no entanto, uma tarefa desafiadora devido à grande quantidade de informações geradas (Gomez-Cabrero et al., 2014).

Diante disso, a utilização de estudos ômicos, com uma abordagem transcriptômica, proteômica e metabolômica, se tornam de suma importância para uma observação melhor respaldada acerca do que ocorre em cada etapa do processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação de *A. psidii* (MF-01) em plantas de *E. grandis*

Para o estudo do processo de infecção do patógeno em eucalipto, cinco clones do genótipo Susceptível 04 (S4) foram preparados, aclimatados e inoculados com a linhagem monopostular MF-01 (10^5 esporos mL^{-1}). As plantas foram mantidas em condições homogêneas, com temperatura de 20°C e 12 horas de luz por dia, para garantir uma infecção eficiente do patógeno conforme descrito por Leite (2012). As plantas foram mantidas no escuro nas primeiras 24 horas após a inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Os intervalos de estudo estabelecidos para amostragem do material biológico foram: (1) zero horas após a inoculação (h.a.i) – controle e (2) 144 h.a.i. As folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer à -80°C.

Extração das proteínas

Folhas inoculadas com urediniósporos *A. psidii* (MF-01), proveniente de plantas de *E. grandis* foram submetidas à extração de proteínas nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i.

Inicialmente as folhas, de acordo com seu tratamento, foram trituradas em almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram pesadas para a obtenção de uma massa comum entre tratamentos e repetições, totalizando 200 mg de material vegetal por amostra.

Em cada tubo com material vegetal triturado foi adicionado 7,5 mL do tampão de extração [0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 0,7 M Sacarose; 0,1 M Cloreto de potássio; 50 mM EDTA; 1mM PMSF; 2% (v/v) β -mercaptoetanol e 1% (m/v) PVPP (Hurkman; Tanaka, 1986). Em seguida as amostras foram submetidas à agitação (70 rpm) constante por 30 minutos imersos em caixa de isopor com gelo triturado. Logo após foram adicionados 7,5 mL de uma solução de fenol equilibrado com 10 mM de Tris-HCl pH 8, sendo novamente submetidos ao gelo e agitação constante (70 rpm) por 30 minutos, com posterior centrifugação (10.000 g) por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi recuperado e o processo de adição do tampão de extração, seguido de agitação e centrifugação, foram realizadas por três vezes. O sobrenadante foi recuperado e transferidos para novos tubos, sendo adicionado 20 mL do tampão de precipitação

(metanol 100% + 0,1 M acetato de amônio), mantendo as amostras à -20°C *overnight*. No dia seguinte foi realizada a centrifugação (16.000 g) por 20 minutos à 4°C para obtenção do *pellet* proteico. Os *pellets* foram então lavados com um tampão contendo metanol 100% + 0,1 M de acetato de amônio. Esta lavagem foi realizada três vezes, e entre cada lavagem as amostras foram centrifugadas (16.000 g à 4°C), e o sobrenadante descartado. Em seguida 15 mL do tampão foram adicionados e se procedeu do repouso por 1 hora à -20°C . Após estas lavagens e a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e se adicionou às amostras 30 mL de outro tampão de lavagem com acetona 100%, sendo submetidas por 1 hora à -20°C . Seguiu-se novamente à centrifugação 16.000 g por 30 minutos à 4°C . O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram secos em dissecador à 4°C por 24 horas.

As proteínas totais provenientes da extração foram ressuspendidas em 300 μL de tampão de solubilização - TCT [7 M uréia, 2 M tiuréia, 10 mM DTT e 0,4% (v/v) Triton X-100], sendo em seguida centrifugados por 30 minutos à 16000 g e 4°C . O sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocados em à -80°C .

Dessalinização das amostras

A dessalinização foi realizada com o auxílio de filtros Amicon®Ultra 3KDa (Millipore), onde ocorreu a substituição do tampão de solubilização ao qual as amostras foram submetidas por um tampão com bicarbonato de amônio 50 mM e pH 8,5, de acordo com as normas indicadas pelo fabricante. Inicialmente as colunas foram hidratadas com 400 μL de água grau MS (Sigma-Audrich), seguindo da centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados aos filtros as amostras no seu volume total (300 μL da amostra adicionado de 100 μL de água grau MS), e centrifugadas como mencionado anteriormente. Em seguida foram adicionados sempre 400 μL de bicarbonato de amônio 50 mM com posterior centrifugação a 14000 g e 18°C por 10 minutos. Este procedimento foi realizado 5 vezes. Finalmente as amostras foram estocadas à -80°C até se realizar a digestão. Estas estavam em volume final de 300 μL .

Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas presente em cada amostra do estoque (300 μL) foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (Bradford, 1976), com o auxílio de um kit comercial Biorad® e um aparelho espectrofotômetro Hitachi modelo U-3300. As leituras de absorvância foram feitas com comprimento de onda de 595 nm, com três repetições. A partir das repetições foram calculadas as médias, e estas utilizadas na equação da reta para obtenção da curva padrão. Assim foram obtidas a concentração de proteínas, em $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, em cada amostra. Desta forma, 25 μg de proteínas foram separadas em alíquotas para a realização da digestão.

Digestão das amostras

Após a quantificação de proteínas referentes a cada amostra, uma alíquota de 25 μg de proteína foi aplicada em gel de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970). Este volume foi somado ao tampão de desnaturação (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, 10% (m/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoetanol e 1% (m/v) Bromofenol Blue), obtendo-se um volume final de 30 μL . A corrida no gel ocorreu por 1 hora, à uma voltagem constante de 50 volts.

Após a corrida do gel, este foi transferido para uma solução fixadora [40%(v/v) etanol e 10%(v/v) ácido acético) por 1 hora, visando a imobilização das proteínas no gel. Em seguida o gel foi transferido para uma solução contendo o corante *Comassie Blue G250*, de acordo com Candiano et al. (2004). Finalmente o gel foi lavado em água MilliQ até serem observados os perfis proteicos de cada amostra. Em seguida, cada banda referente às proteínas totais de uma amostra, foi retirada e fragmentada em pedaços de aproximadamente 1 mm, realizando, por conseguinte, a digestão a partir do gel de acordo com Shevchenko et al. (1996), como descrito no item 2.7 do Capítulo 1.

Após a digestão dos peptídeos as amostras foram purificadas conforme descrito por Rappsilber et al. (2007).

Análise por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa (LC-MS / MS)

Uma alíquota de 4,5 uL da mistura resultante de peptídeos de cada amostra foi carregada no espectrômetro de massa LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conectado a um instrumento NLC de LC (MS-MS / MS) por um sistema EASY (Proxeon Biosystems, West Palm Beach, FL, EUA) com uma fonte de íons de eletrodos por pulverização.

Os peptídeos foram separados por gradiente de acetonitrila de 2% a 90% em ácido fórmico a 0,1% usando uma coluna analítica Pico (20cm x ID75 µm, tamanho de 5 µm, novo objetivo, Woburn, MA, EUA), com uma taxa de fluxo de 300nL.min⁻¹ por 45 minutos. Em seguida, os eletroeletrônicos repelem a tensão de 1,7kV e a temperatura é de 275 ° C. Todos os métodos de equipamento foram configurados no modo de aquisição dependente de dados. A varredura completa dos espectros de MS (m / z 300-1600) foi adquirida pelo analisador Orbitrap após a acumulação no valor-alvo de 1e6. A solução foi definida como = 60.000 e os íons peptídicos mais intensos com os estados de carga 2 foram isolados sequencialmente para um valor de 5.000 e fragmentados na armadilha de linearização usando CID de baixa energia (energia de colisão normalizada de 35%). A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de tamanho de exclusão de 500, duração de exclusão de 60 segundos e contagem de repetições de 1. Foi usada uma ativação q = 0,25 e tempo de ativação de 10ms.

Análise de dados

Os espectros MS / MS foram gerados a partir do arquivo de dados brutos com o protomas 1.3 (ThermoFisher Scientific) utilizando o mecanismo de busca Sequest (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA; versão 1.4.0.288). Os parâmetros utilizados foram: oxidação de metionina (+ 15.995Da) como modificação não variável, tolerância de 10ppm para precursor e 1,0 Da para íons fragmentos. Para quantificação de proteínas, os arquivos de dados foram analisados no Scaffold Q + (versão Scaffold_4.4.1.1, Proteoma Software, Inc., Portland, OR, EUA) e o valor quantitativo (contas espectrais normalizadas) foram obtidos com os limiares de proteína com uma probabilidade máxima de 90% e pelo menos um peptídeo com limiares estabelecidos com uma probabilidade mínima de 60% e cortes de X +1> 1,8, + 2> 2,2, + 3> 2,5 e +4> 3,5 para manter menos que 1% de FDR. Somente peptídeos com um mínimo de cinco resíduos de aminoácidos, w que apresentaram limiar significativo (p <0,05) no sistema de base de pesquisa, foram considerados como produto da clivagem de peptídeos. O peptídeo foi considerado único,

diferenciado no resíduo de aminoácido pelo menos 1; peptídeos covalentemente modificados, incluindo alongamento do terminal N ou C (isto é, clivagens perdidas) foram contados como únicos, e diferentes estados de carga do mesmo peptídeo e modificações não foram contados como únicos.

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de pico (.mgf, formato genérico do Mascot) sem adicionar as varreduras. Foi utilizado como base, referência para o banco de dados, o trabalho publicado por Myburg et al. (2014). O arquivo em formato .fasta foi baixado do National Center of Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a busca de proteínas relacionadas ao Eucalipto. Resumidamente, o sequenciamento de *A. psidii* (MF-01) foi realizado utilizando várias tecnologias de sequenciamento: MiSeq, HiSeq2500 (Pair end e Mate Pair), PacBio e Roche 454. Os dados foram processados, montados e anotados usando vários programas: SPAdes (v.3.9.1), RepeatMasker (v. 4.0.7), TopHat, Augustus (v. 1.1), PASA (v. 2.1.0), EvidenceModeler (v 1.1.1), Blast (v. 2.6.0), InterproScan, Blast2go (v. 4.1.9 PRO), entre outros (Altschul et al., 1990; Trapnell; Pachter; Salzberg, 2009; Conesa et al., 2005). O alinhamento dos dados RNASeq foi realizado com o genoma de referência mascarado de *A. psidii* (sem a presença de elementos transponíveis e retrotransposons) que contém 47.121 ORFs (dados não publicados).

A quantificação relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo índice de abundância de proteínas exponencialmente modificado (emPAI), obtido no software Mascot Distiller (Ishihama et al., 2005). Os parâmetros de pesquisa incluíram tripsina como protease, com um máximo de 1 clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Foi utilizada tolerância de 0,1 Da para precursor (MS) e fragmento (MS / MS) de íons e massa molecular monoisotópica.

Análise estatística

As proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os tratamentos analisados foram acessadas a partir do programa online MetaboAnalyst4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). A matriz de dados gerados (com as proteínas que foram encontradas em pelo menos duas, das três repetições) foi normalizada por transformação em log (*log transformation*) e dimensionados por pareto (*pareto scaling*), a fim de auxiliar na comparação dos dados. Como análise univariada foi realizado a ANOVA. Análises multivariadas também foram geradas, como PLS-DA (análise discriminante de mínimos

quadrados parciais), PCA (análise de componentes principais) e VIPs (importância das variáveis nas projeções multivariadas) com $score \geq 1,5$ (Akarachantachote; Chadchan; Saithanu, 2014). A partir destas análises foi possível identificar os fatores que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre as proteínas na comparação entre tratamentos.

Integração de dados proteômicos entre *E. grandis* e *A. psidii*

A fim de reduzir a discrepância das escalas, os conjuntos de dados foram dimensionados usando o Z-score. Esta metodologia dimensiona os dados definindo a média = 0 e o desvio padrão = 1. Após o escalonamento, os parâmetros de regularização foram realizados usando a função `tune.rcc ()`, onde um conjunto de valores positivos foi escolhido para avaliar a pontuação de validação cruzada (cv-score) para cada ponto na rede. Todas essas funções fazem parte do pacote `mixOmics 5.2` (Lê Cao; González; Déjean, 2009).

Em seguida, a função `rcc ()` foi usada para realizar a análise de correlação canônica regularizada (rCCA) e, finalmente, a função `network ()` foi usada para criar as redes.

Para construir as redes, um limiar foi escolhido a fim de obter redes biológicas interpretáveis, que não são nem muito densas nem muito esparsas (Wallace et al., 2014).

As redes de correlação foram exportadas para o software Cytoscape 3.5.1 (Shannon et al., 2003) para análise posterior. Utilizou-se o layout orgânico, com o diâmetro dos nós em relação ao número de arestas não direcionadas, pois quanto maior o nó, mais arestas ele possui. O valor de correlação é destacado pela intensidade da cor da borda, variando de verde escuro (correlação negativa) a vermelho escuro (correlação positiva). Finalmente foi selecionado o limite de 0,99 para construir a rede de integração.

Extração de metabólitos

Folhas inoculadas com urediniosporos de *A. psidii* MF-01 do patógeno foram submetidas à extração de metabólitos. Inicialmente o primeiro par de folhas de cada ramo, coletadas em 0 h.a.i e 144 h.a.i, foram trituradas em almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram pesadas para a obtenção de uma massa comum entre tratamentos e

repetições, sendo de 50 mg de material para o modo positivo de operação e de 150 mg para o modo negativo de operação.

Em cada amostra foi pipetado 500 uL do solvente de extração composto por clorofórmio/água/metanol (20/20/60%) adicionado de uma solução de quercetina/etanol 100% (1mg/1mL) como padrão interno para marcação isotópica. Os tubos foram homogeneizados. Após o procedimento anterior, as amostras foram sonicadas sem aquecimento e com a adição de gelo por 15 minutos (UltraCleaner 1600A– Unique), seguindo da centrifugação por 10 minutos à 14000 g e 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro Whatmann com 0,22 um de porosidade, sendo logo transferido para vials e armazenado à -80°C.

Separação e análise de metabólitos

Cromatografia Líquida (LC)

Os metabólitos foram analisados por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS). Após a separação no cromatógrafo líquido, as amostras foram automaticamente injetadas e analisadas em equipamento Q-TOF Ultima API (Waters, Manchester, UK) de alta resolução, usando ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo (ESI⁺) e no modo negativo (ESI⁻).

Para cada uma das repetições biológicas foram adicionadas três repetições técnicas, totalizando 15 repetições por tratamento.

Fragmentação e identificação de metabólitos (LC-MS)

Os metabólitos selecionados foram submetidos a fragmentação para a elucidação de sua identidade por (MS/MS). Para a fragmentação dos metabólitos foram utilizadas três energias de colisão: 20eV, 30eV e 50eV.

Após a fragmentação e a montagem da estrutura dos metabólitos por MS/MS, foi realizada a comparação com estruturas encontradas no programa HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) de

acordo com a massa do composto. A partir disto, foi elucidada a estrutura e a identificação do metabólito.

Cromatografia Gasosa (GC)

Para as análises de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS), alíquotas de 100 uL do extrato de metabólitos (item 2.3) de amostras do modo positivo, foram transferidas para novos *vials* e concentrados à vácuo. Nesta etapa foram utilizadas três repetições biológicas. Em seguida foram adicionados 10uL dos padrões externos (ácido palmítico, ácido succínico e ácido mirístico), todos com concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A derivatização foi realizada pela adição, à cada amostra, de 30 uL de metoxiamina ($15\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em piridina, sendo então vortexadas por 1 minuto para homogeneização e mantidas em repouso à temperatura ambiente na ausência de luz por 16 horas. Após este período foi adicionado 30 uL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras permaneceram em repouso por 1 hora em temperatura ambiente.

Finalmente foram adicionados 30 uL de heptano. Logo em seguida as amostras foram analisadas no equipamento GC-TOFMS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph, US).

Processamento de dados brutos

Após a separação dos metabólitos e a análise (nos modos negativo e positivo proveniente do LC-MS e de amostras do modo positivo para o GC-MS realizados nos itens anteriores), os dados foram submetidos à um processamento prévio para a detecção de candidatos a metabólitos. Esta primeira análise para remoção de ruídos e normalização de dados foi realizada no programa MarkerLynx (Waters, Manchester, UK). Em seguida os dados foram transferidos para um arquivo Microsoft Excel. Os candidatos a metabólitos que apresentaram valor zero em mais de 50% do total de repetições receberam valor zero em todas as repetições para evitar a presença de falso-positivos.

Análise estatística dos dados obtidos por LC-MS e GC-MS

Os metabólitos que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os tratamentos analisados foram acessados através do programa *online* MetaboAnalyst4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). As intensidades de picos relacionados as massas obtidas foram normalizadas usando a massa da quercetina como referência. A matriz de dados gerados foi filtrada por “intervalo interquartil” (*Interquantile range – IQR*), normalizados por transformação em *log* (*log transformation*) e dimensionados por pareto (*pareto scaling*), a fim de auxiliar na comparação dos dados. Análises multivariadas foram geradas, como PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais), PCA (análise de componentes principais) e VIPs (importância das variáveis nas projeções multivariadas) com *score* $\geq 1,5$ (Akarachantachote; Chadchan; Saithanu, 2014). A partir destas análises foi possível identificar os fatores que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os metabólitos na comparação dos tratamentos. Para o LC-MS foi selecionado o top 50 (para o modo positivo de operação) e o top 9 (no modo negativo de operação), e para o GC-MS foi selecionado o top 32. Esta seleção foi realizada de acordo com os picos mais discriminatórios baseado no modelo de classificação PLS-DA, teste t e pela pontuação da análise VIPs.

RESULTADOS

Proteínas de *A. psidii* identificadas durante o processo de infecção em *E. grandis*

Com a análise proteômica de *A. psidii* (MF-01) durante o processo de infecção em *E. grandis* foram identificadas no total 143 proteínas. Deste total, 40 foram identificadas exclusivamente às 0 h.a.i, 59 às 144 h.a.i e 44 foram comuns a ambos os tempos (Figura 3.1).

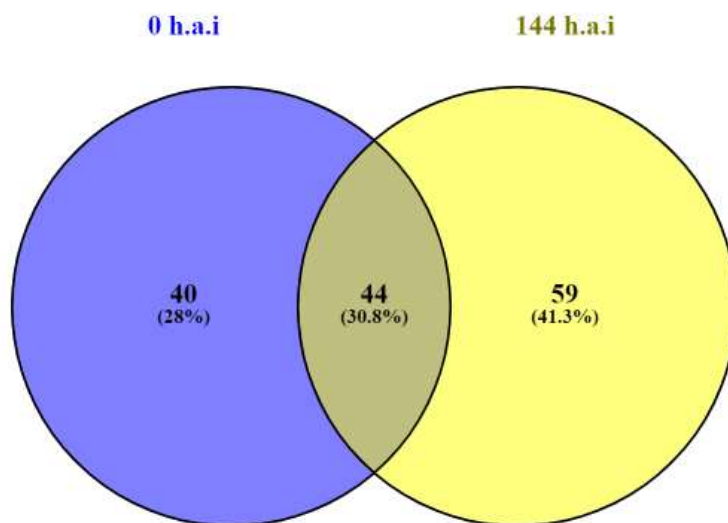


Figura 3.1. Proteínas identificadas de MF-01 inoculadas em *E. grandis*. As proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção. Tempos estudados: 0 h.a.i e 144 h.a.i.

Foi possível observar, com respaldo na análise *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA), que as proteínas identificadas em cada um dos tempos analisados modificam o perfil proteico de *A. psidii* durante o processo de infecção em *E. grandis* (Figura 3.2). A quantidade maior de proteínas identificadas no tempo final analisado neste trabalho (144 h.a.i) pode estar relacionado ao maior tempo de colonização do fungo nos tecidos da planta.

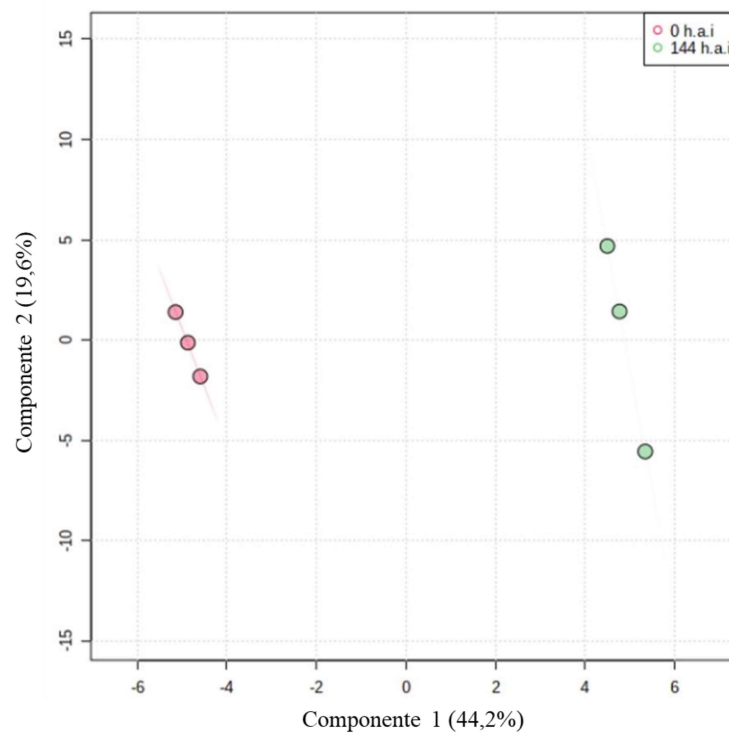


Figura 3.2. *Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA).* A separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de *A. psidii* (MF-01) ocorreu durante o processo de infecção em *E. grandis* nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. $R^2= 0,99$; $Q^2= 0,93$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

A partir da análise VIP foram selecionadas as proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos. Com as análises observadas a partir do gráfico VIP também foi possível identificar qual o tratamento onde a proteína que mais contribuiu para as diferenças de abundância estava em maior concentração (Figura 3.3).

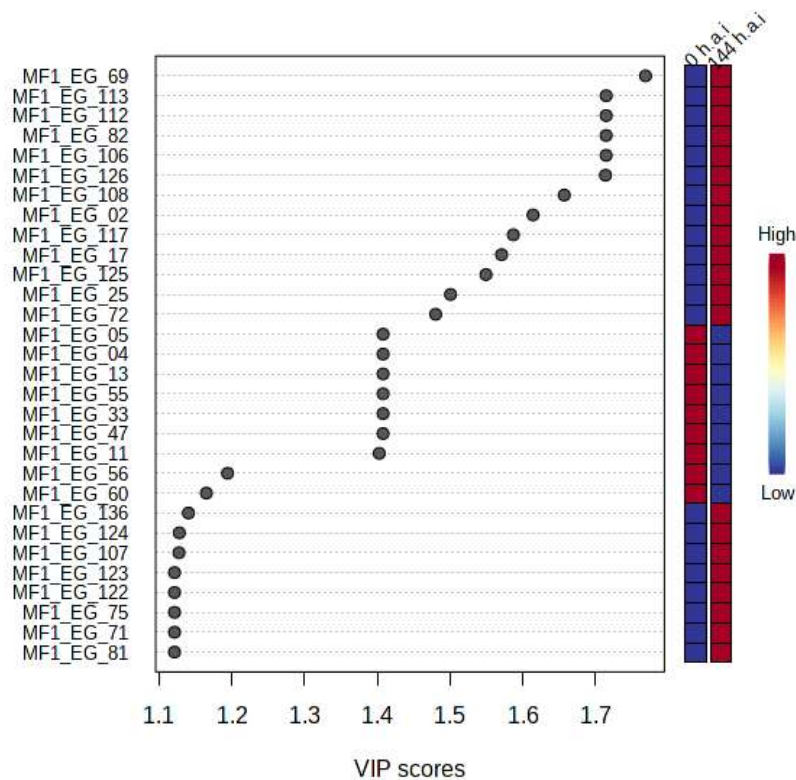


Figura 3.3. *Variable Importance in the Projection* (VIP) com $\text{score} \geq 1$ das proteínas referentes à *A. psidii* (MF-01) que mais contribuíram para a separação dos grupos entre 0 e 144 horas após a inoculação. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

Considerando as 84 (40 exclusivas e 44 comuns) proteínas identificadas às 0 h.a.i, apenas 10 foram selecionadas pelo VIP score (Tabela 3.1). Destas, 5 não tiveram similaridade com nenhuma proteína do banco de dados estudado e foram classificadas como desconhecidas. A proteína *funga* *Zn binuclear cluster domain containing protein* possui função importante para a fase inicial do patógeno, com grande importância na formação do apressório.

Dentre as 103 (59 exclusivas e 44 comuns) proteínas constatadas às 144 h.a.i, 47 foram selecionadas pelo VIP score (Tabela 3.1). Tanto em relação às proteínas totais, como em relação as que mais contribuíram para as diferenças de abundância, a maior quantidade de proteínas identificadas foi às 144 h.a.i. Oito proteínas foram classificadas como desconhecidas, por não apresentarem similaridade com nenhuma outra proteína presente no banco de dados analisado. As proteínas *transaldolase* e *adenosylhomocysteinase* estão associadas a funções de patogenicidade do fungo, sendo importantes para o patógeno durante o processo de infecção às 144 h.a.i.

Tabela 3.1. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em plantas de *A. psidii* durante o processo de infecção em *E. grandis* entre zero e 144 horas após a inoculação.

Tempo	Código da proteína	ID de acesso ¹	Nome da proteína ²
0 horas	MF1_EG_05	XP_007417565.1	<i>uncharacterized protein MELLADRIFT_73447</i>
	MF1_EG_04	--	<i>Not found</i>
	MF1_EG_13	--	<i>Not found</i>
	MF1_EG_55	KNE89352.1	<i>ADP, ATP carrier protein</i>
	MF1_EG_33	A0A0M1YX31	<i>Uncharacterized protein</i>
	MF1_EG_47	A0A167T8Y6	<i>Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein</i>
	MF1_EG_11	E3KFB8	<i>Ubiquitin</i>
	MF1_EG_56	--	<i>Not found</i>
	MF1_EG_60	M2UVM9	<i>Carboxypeptidase</i>
	MF1_EG_03	A0A2S4VTP9	<i>Histone H4</i>
	MF1_EG_69	E3JPY7	<i>ADP-ribosylation factor</i>
	MF1_EG_113	--	<i>Not found</i>
	MF1_EG_112	--	<i>Not found</i>
	MF1_EG_82	A0A2S4WN79	<i>Brix domain-containing protein</i>
144 horas	MF1_EG_106	A0A5B0M6Y1	<i>Adenylate kinase</i>
	MF1_EG_126	A0A5B0M477	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit</i>
	MF1_EG_108	E3JVS0	<i>Heat shock protein 83</i>
	MF1_EG_02	E3KQW1	<i>Polyubiquitin-A</i>
	MF1_EG_117	A0A5B0LSD6	<i>Adenosylhomocysteinase</i>
	MF1_EG_17	A0A5B0RXE1	<i>Histone domain-containing protein</i>
	MF1_EG_125	E3K3E3	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
	MF1_EG_25	E3L015	<i>H(+)-transporting two-sector ATPase</i>
	MF1_EG_72	A0A5B0NRK5	<i>Pep3_Vps18 domain-containing protein</i>
	MF1_EG_136	A0A5B0MF74	<i>Chaperonin</i>
	MF1_EG_124	A0A0C4EHH9	<i>Uncharacterized protein</i>

MF1_EG_107	A0A1L7UGJ8	<i>ULP_PROTEASE domain-containing protein</i>
MF1_EG_123	A0A1E1LVB6	<i>Related to sucrose cleavage protein</i>
MF1_EG_122	A0A5B0R3C0	<i>Proteasome subunit beta</i>
MF1_EG_75	A0A5B0QLC7	<i>Prohibitin</i>
MF1_EG_71	E3KVG0	<i>S5 DRBM domain-containing protein</i>
MF1_EG_81	A0A5B0QQJ1	<i>Uncharacterized protein</i>
MF1_EG_119	A0A5B0P305	<i>CYTOSOL_AP domain-containing protein</i>
MF1_EG_127	E3L414	<i>AGC/PKA protein kinase</i>
MF1_EG_120	E3K2R3	<i>TP-binding cassette, sub-family F</i>
MF1_EG_114	E3L795	<i>Uncharacterized protein</i>
MF1_EG_28	E3L1S9	<i>Valyl-tRNA synthetase</i>
MF1_EG_34	A0A5B0NIY8	<i>PWI domain-containing protein</i>
MF1_EG_130	E3KN08	<i>Histone H2A</i>
MF1_EG_137	A0A1H6PXS3	<i>Profilin</i>
MF1_EG_132	P51997	<i>60S ribosomal protein L25</i>
MF1_EG_109	--	<i>Not found</i>
MF1_EG_135	A0A2S4VM48	<i>Sister chromatid cohesion protein</i>
MF1_EG_140	--	<i>Not found</i>
MF1_EG_138	A0A5B0R849	<i>Transket_pyr domain-containing protein</i>
MF1_EG_143	E3K259	<i>Autophagy_act_C domain-containing protein</i>
MF1_EG_142	A0A5B0PR91	<i>DNA replication licensing factor MCM2</i>
MF1_EG_105	--	<i>Not found</i>
MF1_EG_115	E3KXK0	<i>Phosphopyruvate hydratase</i>
MF1_EG_139	A0A291PNL4	<i>Tubulin beta chain</i>
MF1_EG_141	E3K1Q1	<i>Peroxidase</i>
MF1_EG_131	E3KQW1	<i>Polyubiquitin-A</i>
MF1_EG_128	E3KJR8	<i>Aspartate aminotransferase</i>
MF1_EG_84	E3KXR8	<i>60S ribosomal protein L12</i>

*Suppressor of the cold-sensitive snRNP bioproteins mutant
brr1*

MF1_EG_74	A0A5B0PFP1
MF1_EG_91	E3JSQ1
MF1_EG_134	H6QUM4
MF1_EG_133	G1AHU3

Transaldolase

Histone H2A

Glucanase

¹ ID de acesso é a identificação de acesso da proteína no banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

² Nome da proteína de acordo com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

Proteínas de *E. grandis* identificadas durante processo de infecção por *A. psidii*

Após a análise proteômica do processo de infecção de *A. psidii* em plantas de *E. grandis*, foram detectadas 2.156 proteínas totais referentes à *E. grandis*. Deste total, 692 proteínas foram comuns a ambos os tempos analisados, 404 proteínas só foram encontradas às 0 h.a.i, e 368 às 144 h.a.i (Figura 3.4).

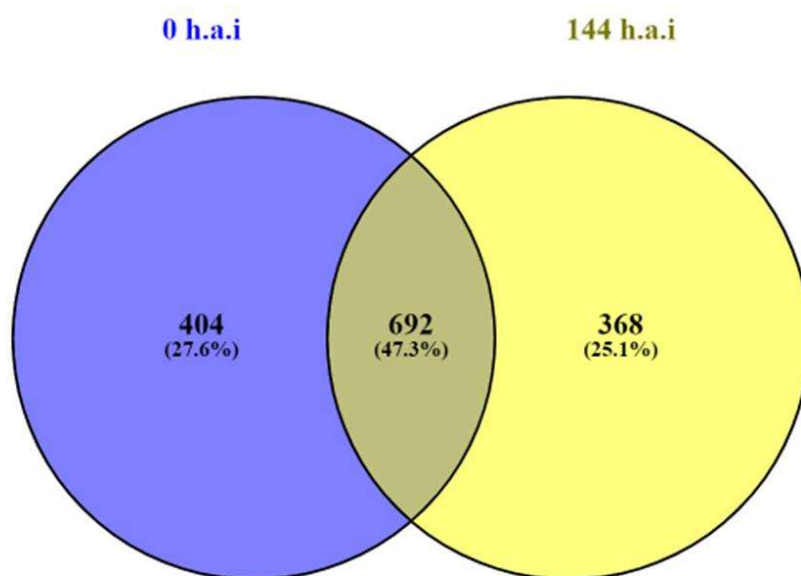


Figura 3.4. Proteínas identificadas de *E. grandis* inoculadas com MF-01. As proteínas encontradas exclusivamente em cada um dos tempos analisados e comuns em dois ou mais tempos de infecção. Tempos estudados: 0 h.a.i e 144 h.a.i.

Pôde-se observar por meio da análise *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA), que as proteínas identificadas em cada um dos tempos analisados modificam o perfil proteico de *E. grandis* durante o processo de infecção por *A. psidii*, de acordo com o tempo de interação na doença (Figura 3.5).

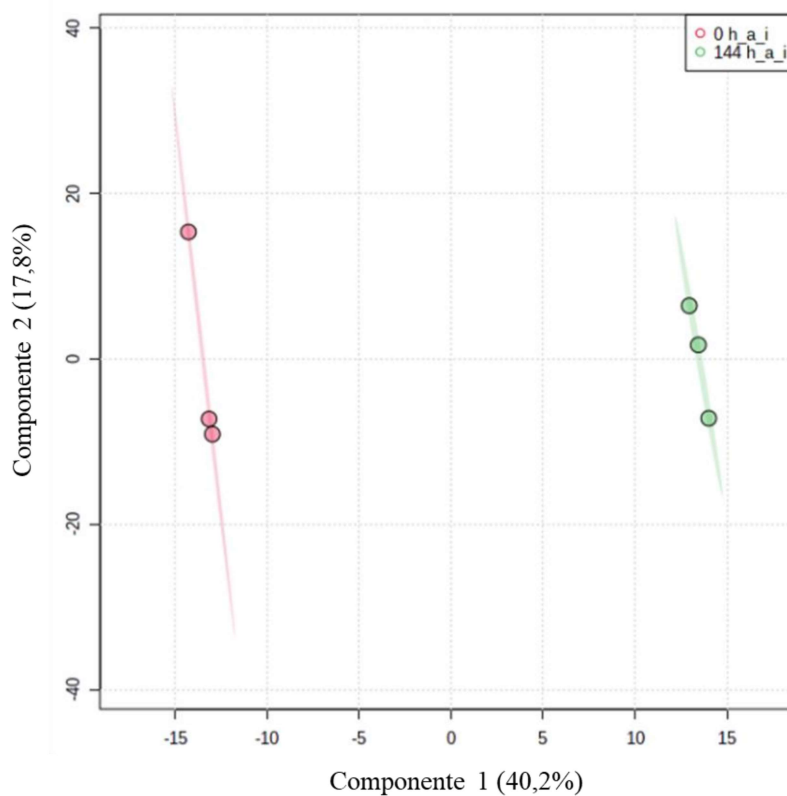


Figura 3.5. *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) mostrando a separação das amostras entre grupos distintos, relacionados às proteínas identificadas de *E. grandis* durante o processo de infecção por *A. psidii* (MF-01) nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. $R^2= 0,99$; $Q^2= 0,99$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

As 137 proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância (68 às 0 h.a.i e 69 às 144 h.a.i) foram identificadas baseado na análise VIP, sendo essas as proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos (Figura 3.6).

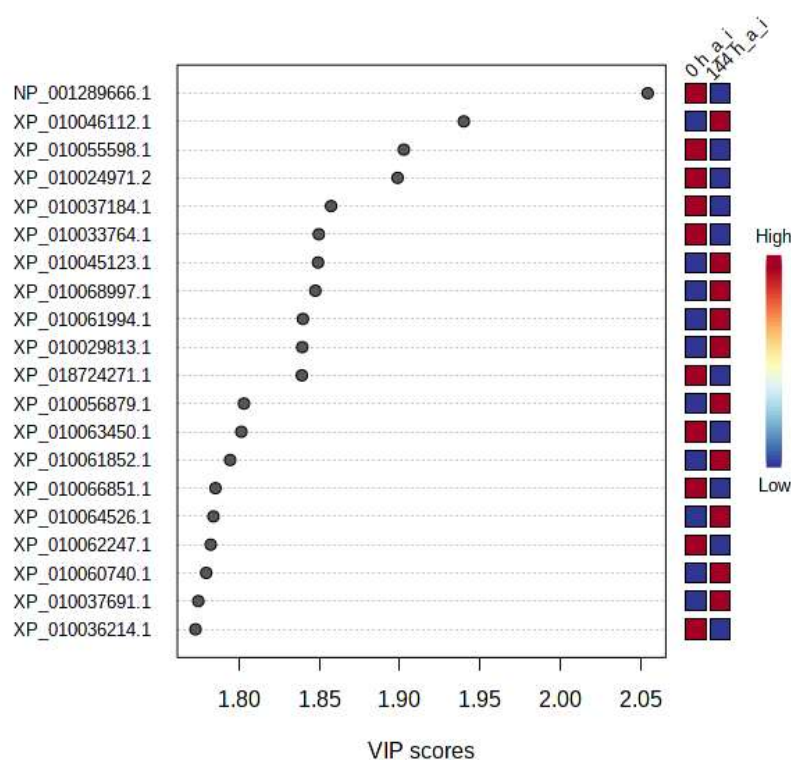


Figura 3.6. Variable Importance in the Projection (VIP) com $score \geq 1,5$ das proteínas identificadas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* (MF-01) que mais contribuíram para a separação dos grupos entre 0 h.a.i e 144 h.a.i. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

Dentre as proteínas totais (404 exclusivas mais 692 comuns entre os tempos analisados) identificadas e associadas a plantas de *E. grandis* às 0 h.a.i, 66 foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância (Tabela 3.2). Três delas não obtiveram similaridade com nenhuma das proteínas do banco de dados utilizado, aparecendo como desconhecidas. Baseado nas funções das proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância, as proteínas *rubisco accumulation factor 1* e *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* ganharam destaque às 0 h.a.i, estando associadas à função metabólica da planta, relacionadas à produção de energia.

Em relação às proteínas totais (368 exclusivas mais 692 comuns entre os tempos analisados) identificadas às 144 h.a.i, 69 foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância (Tabela 3.2). Destas, seis foram classificadas como desconhecidas, ou seja, não possuíam similaridade com nenhuma proteína presente no banco de dados confrontado. As proteínas *major allergen Pru av 1-like*, *abscisic stress ripening protein*, *actin-7*, *V-type proton ATPase*, *proteasome subunit alpha*, *malate dehydrogenase* e *isoflavone reductase-like protein*

foram selecionadas por terem funções interessantes relacionadas ao processo de defesa da planta contra o ataque do patógeno.

Tabela 3.2. Proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância identificadas em plantas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* entre zero e 144 horas após a inoculação.

Tempo	ID de acesso ¹	Nome da proteína ²
	NP_001289666.1	<i>tubulin beta-5 chain</i>
	XP_010055598.1	<i>plant UBX domain-containing protein 8</i>
	XP_010024971.2	<i>rubisco accumulation factor 1</i>
	XP_010037184.1	<i>ribulose-phosphate 3-epimerase</i>
	XP_010033764.1	<i>eukaryotic initiation factor 4A-2</i>
	XP_018724271.1	<i>phosphomethylpyrimidine synthase</i>
	XP_010063450.1	<i>UDP-sugar pyrophosphorylase isoform XI</i>
	XP_010066851.1	<i>14-3-3-like protein GF14 iota</i>
	XP_010062247.1	<i>probable fructokinase-6</i>
	XP_010036214.1	<i>photosynthetic NDH subunit of subcomplex B 2</i>
	XP_010053364.1	<i>PGR5-like protein 1A</i>
	XP_018732861.1	<i>beta-hexosaminidase 1</i>
0 h.a.i	XP_010029191.1	<i>2-methylene-furan-3-one reductase</i>
	XP_010048208.1	<i>DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56 isoform XI</i>
	XP_010043386.1	<i>stress-response A/B barrel domain-containing protein HSI</i>
	XP_010037065.1	<i>glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 1</i>
	XP_018715347.1	<i>dihydrodipolylysine-residue acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex</i>
	XP_010051031.1	<i>50S ribosomal protein L6</i>
	XP_010024397.1	<i>stem-specific protein TSJT1-like</i>
	XP_010028205.1	<i>cysteine proteinase COT44</i>
	XP_010037338.1	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP26-2</i>
	XP_010031154.1	<i>uncharacterized protein LOC104421032</i>
	XP_010063443.1	<i>NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M</i>
	XP_010060936.1	<i>deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase</i>

XP_010028471.1	<i>ferredoxin-nitrite reductase</i>
XP_010046961.1	<i>villin-4 isoform XI</i>
NP_001289655.1	<i>sucrose synthase</i>
XP_010043227.1	<i>uncharacterized protein LOC104432476</i>
XP_010061721.1	<i>low-temperature-induced cysteine proteinase</i>
XP_010030753.1	<i>uncharacterized protein LOC104420646</i>
XP_010052743.1	<i>haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein Sgpp</i>
XP_010030095.1	<i>probable plastid-lipid-associated protein 4</i>
XP_010060582.1	<i>protein SRC2 homolog</i>
XP_010029154.1	<i>hypothetical protein EUGRSUZ_I01779</i>
XP_010069614.1	<i>40S ribosomal protein S8</i>
XP_010031617.1	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase isoform XI</i>
XP_010060252.1	<i>40S ribosomal protein S8</i>
XP_010024049.1	<i>adenosylhomocysteinase 1 isoform XI</i>
XP_010061240.1	<i>pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha</i>
XP_010052001.1	<i>photosystem I reaction center subunit psaK</i>
XP_010033862.1	<i>photosystem I reaction center subunit VI-2</i>
XP_010061434.1	<i>ER membrane protein complex subunit 8/9 homolog</i>
XP_010033272.1	<i>uncharacterized protein At4g28440</i>
XP_010025256.1	<i>60S ribosomal protein L18-2</i>
XP_010062169.1	<i>psbP domain-containing protein 4</i>
XP_010066953.1	<i>hypersensitive-induced response protein 2</i>
XP_010033217.1	<i>mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa</i>
XP_010029190.1	<i>2-methylene-furan-3-one reductase</i>
XP_018721495.1	<i>transcription factor DIVARICATA</i>
XP_010062244.1	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I</i>
XP_010040043.1	<i>flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase</i>
XP_010024257.1	<i>actin-85C</i>
XP_010070121.1	<i>DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3</i>

XP_010037462.1	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 isoform XI</i>
XP_010034060.1	<i>ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase</i>
XP_010027752.1	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</i>
XP_010043569.1	<i>inner membrane protein PPF-1</i>
XP_010057533.1	<i>adenylosuccinate synthetase 2</i>
XP_010045110.1	<i>COP9 signalosome complex subunit 2 isoform XI</i>
XP_010040348.1	<i>crocetin glucosyltransferase</i>
XP_010029830.1	<i>probable Xaa-Pro aminopeptidase P isoform XI</i>
XP_018729797.1	<i>TMV resistance protein N isoform XI</i>
XP_018717453.1	<i>topless-related protein 4 isoform X4</i>
XP_010052367.1	<i>beta-galactosidase 8 isoform XI</i>
XP_010058493.1	<i>rRNA biogenesis protein RRP5</i>
XP_010058177.1	<i>isoflavone reductase-like protein</i>
XP_010046112.1	<i>calreticulin-like</i>
XP_010045123.1	<i>calmodulin-like isoform XI</i>
XP_010068997.1	<i>glycine-rich RNA-binding protein 4</i>
XP_010061994.1	<i>ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit</i>
XP_010029813.1	<i>succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1</i>
XP_010056879.1	<i>chlorophyll a-b binding protein of LHClI type 1</i>
XP_010061852.1	<i>peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO4</i>
XP_010064526.1	<i>heme-binding protein 2-like</i>
XP_010060740.1	<i>phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase</i>
XP_010037691.1	<i>ERBB-3 BINDING PROTEIN 1</i>
XP_010046559.1	<i>isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5</i>
XP_010024122.1	<i>calreticulin isoform X2</i>
XP_010066667.1	<i>ATP synthase subunit beta</i>
XP_010056726.1	<i>abscisic stress-ripening protein 2</i>
XP_010069379.1	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H</i>
XP_010057882.1	<i>plastid-lipid-associated protein</i>

144 h.a.i

XP_018715995.1	<i>heat shock protein 83</i>
XP_010070258.1	<i>BSD domain-containing protein 1 isoform XI</i>
XP_010056109.1	<i>actin-7</i>
XP_010065961.1	<i>cinnamate beta-D-glucosyltransferase-like</i>
XP_010032189.1	<i>uncharacterized protein LOC104421789 isoform XI</i>
XP_010032188.1	<i>uncharacterized protein LOC104421789 isoform X5</i>
XP_010024761.1	<i>major allergen Pru ar 1</i>
XP_010055432.1	<i>GTP-binding protein YPTM2</i>
XP_010061502.1	<i>GEM-like protein 1</i>
XP_010067894.1	<i>60S ribosomal protein L6</i>
XP_010035120.1	<i>membrane steroid-binding protein 2</i>
XP_010024366.1	<i>2-hydroxyisoflavanone dehydratase isoform XI</i>
XP_010060968.1	<i>proteasome subunit alpha type-1-A</i>
XP_010041721.1	<i>phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase</i>
XP_010049097.1	<i>bark storage protein A</i>
XP_010024139.1	<i>NHL repeat-containing protein 2</i>
XP_010036841.1	<i>staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>
XP_010067275.1	<i>ATP synthase subunit d</i>
XP_010055827.1	<i>V-type proton ATPase subunit E</i>
XP_010031463.1	<i>stress-response A/B barrel domain-containing protein</i>
XP_010066606.1	<i>uncharacterized protein LOC104453696 isoform XI</i>
XP_010058068.1	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP13</i>
XP_010043613.1	<i>uncharacterized protein LOC104432783 isoform X3</i>
XP_010044444.1	<i>nodulin-related protein 1</i>
XP_018717267.1	<i>cysteine synthase-like</i>
XP_010024713.1	<i>60S ribosomal protein L22-2</i>
XP_010028226.1	<i>pathogenesis-related protein STH-21</i>
XP_010033165.1	<i>60S ribosomal protein L23a-like</i>
XP_010042451.1	<i>60S ribosomal protein L23a-like</i>

XP_010023368.1	<i>malate dehydrogenase</i>
XP_010051954.1	<i>uncharacterized protein LOC104440706 isoform X1</i>
XP_010052520.1	<i>uncharacterized protein LOC104441195 isoform X1</i>
XP_010041625.1	<i>cysteine synthase isoform X3</i>
XP_010055405.1	<i>isoflavone reductase-like protein</i>
XP_010031715.1	<i>rhodanese-like/PpiC domain-containing protein 12</i>
XP_010025761.1	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 20 homolog 2</i>
XP_010061851.1	<i>peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO4 isoform X2</i>
XP_010051786.1	<i>protochlorophyllide reductase</i>
XP_010044054.2	<i>fructose-1,6-bisphosphatase</i>
XP_010034168.1	<i>alpha-galactosidase 1</i>
XP_010030329.1	<i>MDIS1-interacting receptor like kinase 2-like</i>
XP_010063157.1	<i>7-deoxyloganetin glucosyltransferase</i>
XP_010063153.1	<i>7-deoxyloganetin glucosyltransferase</i>
XP_010052188.1	<i>low-temperature-induced cysteine proteinase</i>
XP_010057104.1	<i>low-temperature-induced cysteine proteinase</i>
XP_010060038.1	<i>phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2</i>
XP_010027915.1	<i>phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2</i>
XP_010059849.1	<i>probable inactive receptor kinase At4g23740</i>
XP_010036240.1	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase</i>
XP_010037748.1	<i>neutral ceramidase</i>
XP_010024457.1	<i>pyruvate, phosphate dikinase, chloroplastic isoform X2</i>
XP_010032221.1	<i>elongation factor 1-alpha isoform X1</i>
XP_010028338.1	<i>serine carboxypeptidase-like 13</i>

¹ ID de acesso é a identificação de acesso da proteína no banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

² Nome da proteína de acordo com o banco de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/> versão de lançamento 08/2020).

Rede de correlação entre proteínas de *E. grandis* e *A. psidii*

A partir dos parâmetros de análise utilizados no presente trabalho, foi possível observar a correlação entre 6 proteínas provenientes de *E. grandis* com uma proteína pertencente à *A. psidii*. De acordo com a intensidade da cor da borda, foi possível identificar uma correlação positiva entre proteínas (vermelho escuro). Há uma correlação entre as proteínas XP_010028896.1 (*eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3*), XP_010056880.1 (*urease accessory protein G*), XP_010062321.1 (*expansin-A13*), XP_010066331.1 (*ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform XI*), XP_010044210.1 (*phosphoglucomutase cytoplasmic isoform X2*), XP_010038186.1 (*glutathione S-transferase F13*) identificadas em *E. grandis* com a proteína evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (*ADP-ribosylation factor*) encontrada no estudo proteômico em *A. psidii* (Figura 3.7). As proteínas XP_010028896.1, XP_010056880.1 e XP_010062321.1 foram identificadas às 144 h.a.i. Enquanto as proteínas XP_010066331.1, XP_010044210.1 e XP_010038186.1 foram encontradas tanto às 0 h.a.i quanto às 144 h.a.i. A proteína evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 foi identificada apenas às 144 h.a.i. Estas proteínas presentes na correlação entre os organismos foram identificadas às 144 h.a.i, podendo ser um indicativo de que possuem um papel importante na fase mais avançada da interação planta-patógeno.

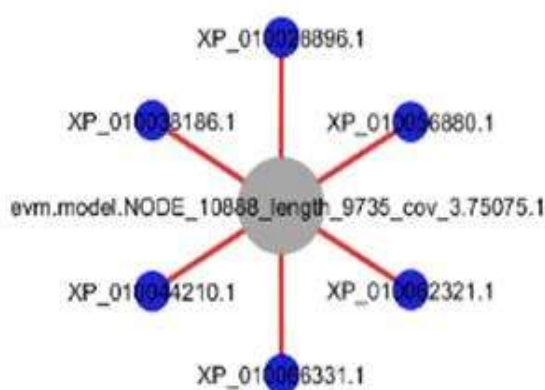


Figura 3.7. Rede de correlação entre proteínas que mais contribuíram para as diferenças de abundância da interação planta-patógeno. A intensidade das cores indica se a correlação foi positiva ou negativa. Verde escuro (correlação negativa) e vermelho escuro (correlação positiva). Nos pontos azuis estão as proteínas associadas a *E. grandis*; no ponto cinza, a proteína identificada em *A. psidii*.

Metabolômica

No total foram reconhecidos 406 possíveis metabólitos provenientes do LC-MS, sendo 309 no modo positivo e 97 no modo negativo de operação. Do total de metabólitos, 92 (com valor zero para mais de 50% do total de repetições) foram descartados após análises realizadas no MarkerLynx, restando 314 para análises estatísticas subsequentes. Em relação ao GC-MS, foram reconhecidos 207 possíveis metabólitos.

Análise de metabólitos totais de plantas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* – LC-MS

Por meio da PCA foi possível observar a tendência de separação entre os grupos, podendo identificar os *outliers*. Há uma nítida separação entre os tratamentos analisados de acordo com a condição submetida, mostrando uma diferença no metabolismo devido à ação do fungo na planta. Não foram detectados *outliers* no grupo de amostras estudados (Figura 3.8).

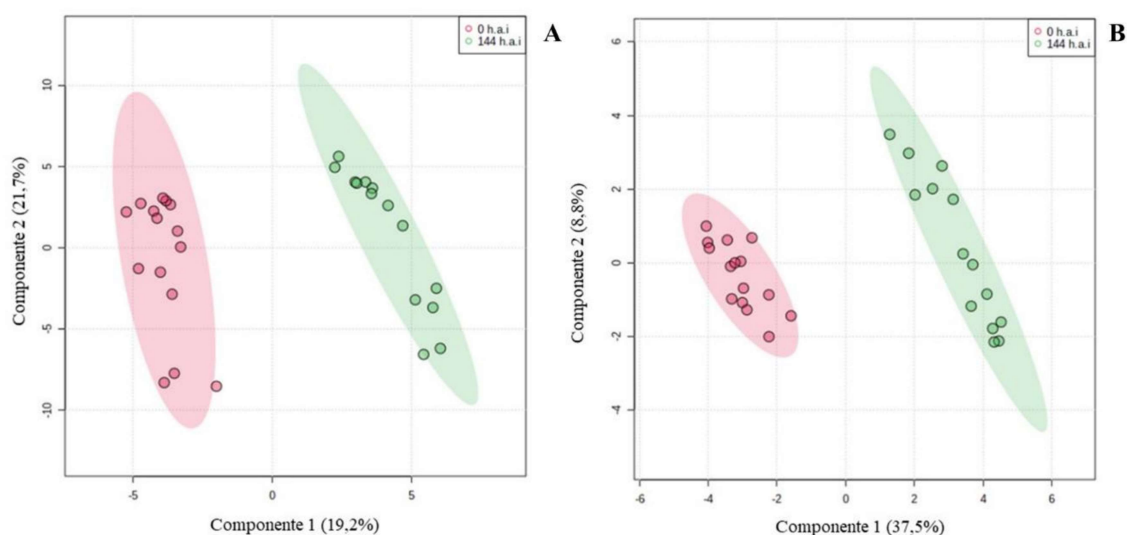


Figura 3.8. Dados provenientes do estudo de LC-MS. Análise de componentes principais (PCA) do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – PCA das amostras no modo positivo de operação ESI⁺. B – PCA das amostras no modo negativo de operação ESI⁻. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

A partir da análise multivariada PLS-DA foi possível observar uma separação entre os grupos de amostras dos tratamentos em ambos os modos de operação (Figura 3.9), indicando que a presença do patógeno na planta influencia o perfil metabólico. Também foi observado um agrupamento dos dados dentro de cada tratamento, mostrando uma pequena variabilidade entre eles com uma significância de $R^2=0,99$ para ambos modos de operação, e $Q^2=0,96$ e $R^2=0,95$ para o modo positivo e negativo, respectivamente.

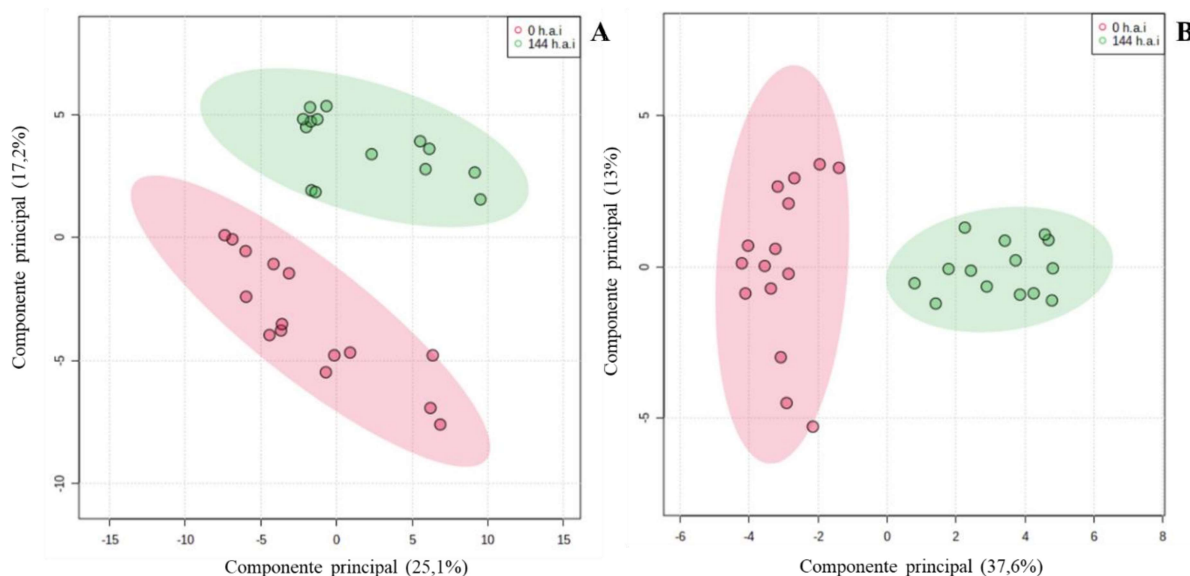


Figura 3.9. Dados provenientes do estudo de LC-MS. Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – PLS-DA das amostras no modo positivo de operação ESI⁺. $R^2=0,99$; $Q^2=0,96$. B – PLS-DA das amostras no modo negativo de operação ESI⁻. $R^2=0,99$; $Q^2=0,95$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

Baseado na análise VIP, foram encontrados 58 metabólitos que mais contribuíram para as diferenças de abundância entre os tratamentos 0 e 144 horas após a inoculação, sendo 49 provenientes do modo positivo e 9 do modo negativo de operação (Figura 3.10). Todos esses metabólitos foram selecionados para a fragmentação e posterior identificação a partir da elucidação estrutural.

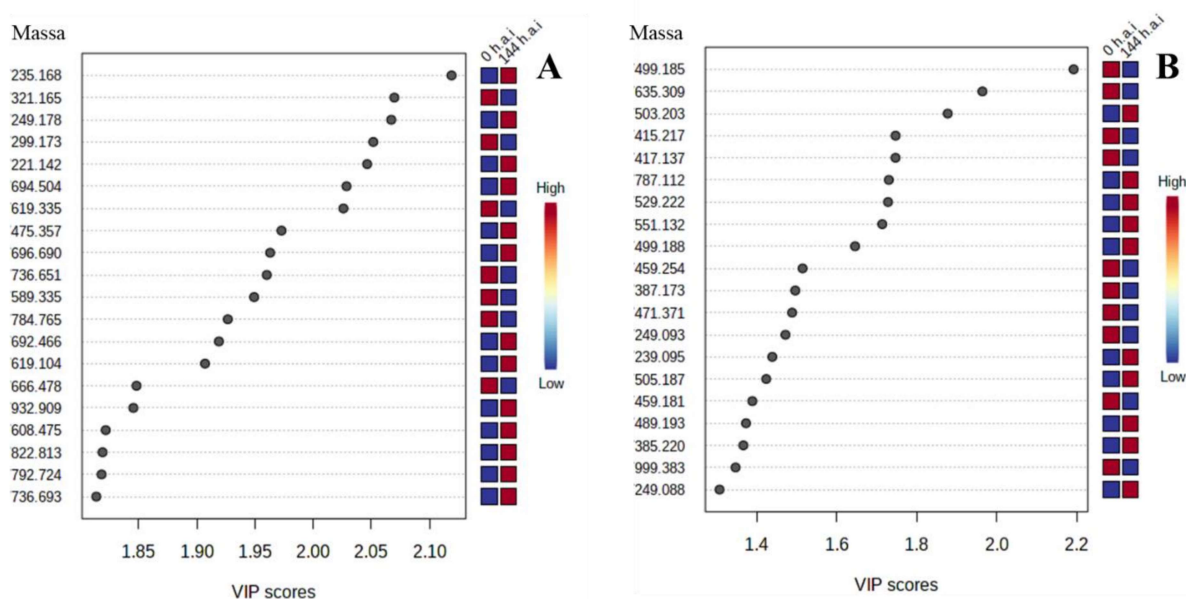


Figura 3.10. Dados provenientes do estudo de LC-MS. Importância das variáveis nas projeções multivariadas (VIPs), com $score \geq 1,5$, do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. A – VIPs das amostras no modo positivo de operação ESI⁺. B – VIPs das amostras no modo negativo de operação ESI⁻. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

Com a análise proveniente da Cromatografia Líquida (LC-MS), no modo positivo de operação, foram identificadas 9 classes de metabólitos às zero horas após a infecção de plantas de *E. grandis* inoculados com *A. psidii*. A maior quantidade de metabólitos identificados foram classificados como glicerofosfolipídeos (6 metabólitos), ácidos graxos (2 metabólitos), e as demais classes possuíram um único metabólito identificado (Figura 3.11A).

Em relação ao estudo metabolômico realizado às 144 horas após a inoculação, os metabólitos identificados foram distribuídos em 13 classes distintas. Dentre estas classes, os metabólitos foram identificados como pertencentes ao grupo dos glicerofosfolipídeos (17 metabólitos), desconhecidos (3 metabólitos), flavonoides, ácidos graxos e lipídeos de prenil (2 metabólitos), e demais classes (1 metabólito) (Figura 3.11B).

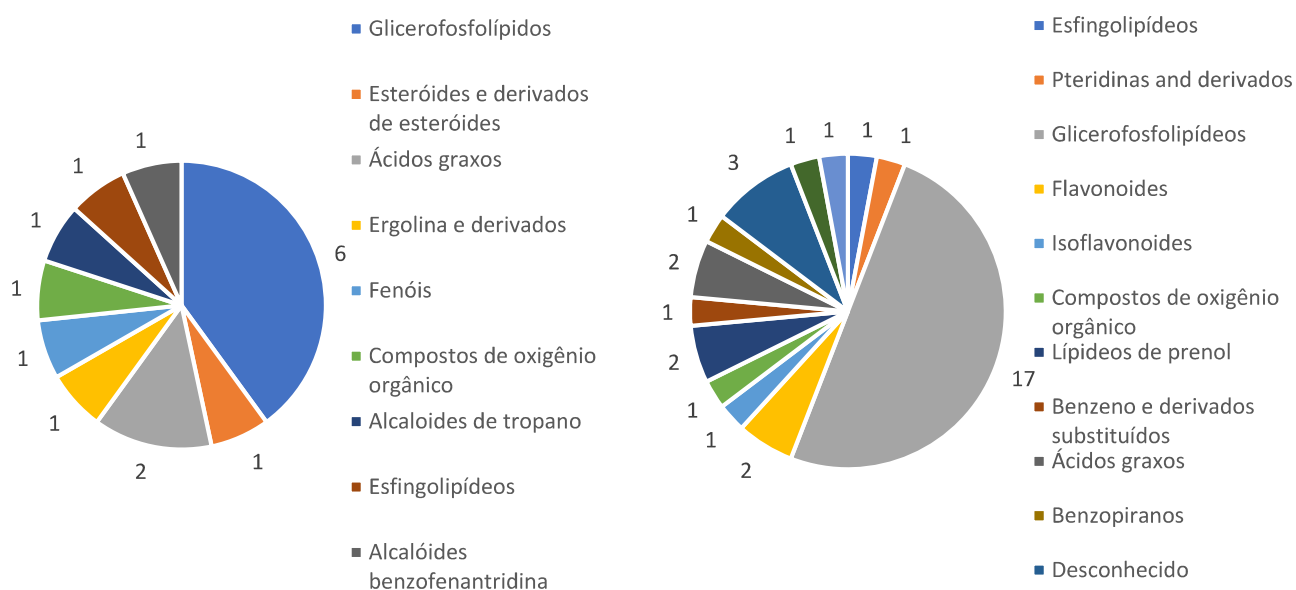


Figura 3.11. Classes de metabólitos identificados durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* provenientes da análise LC-MS no Modo Positivo de Operação. A – Classes de metabólitos presentes às 0 h.a.i. B – Classes de metabólitos presentes às 144 h.a.i.

Durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* (de 0 à 144 horas após a inoculação), baseado na análise de Cromatografia Líquida no modo positivo de operação, foram identificados 50 metabólitos. Onde 16 foram encontrados às 0 h.a.i e 34 às 144 h.a.i (Tabela 3.3).

Dos 16 metabólitos identificados às 0 h.a.i, 8 não possuem identidade conhecida, mas pertencem à classe dos glicerofosfolípídeos. A *oleacein* é classificado como um fenol, e pode estar envolvido na composição da cera cuticular de folhas de *E. grandis*, composto que aparentemente auxilia na germinação de urediniósporos de *A. psidii*.

Em relação aos metabólitos identificados às 144 h.a.i, 17 não possuem identidade conhecida, mas todos também pertencem à classe dos glicerofosfolípídeos. Três não possuíram similaridade com nenhum outro metabólito presente no banco de dados analisado. A *ceramide* é um metabólito da classe dos esfingolípídeos, que pode ter alguma função importante durante o processo de infecção, participando na defesa da planta contra o ataque do patógeno.

Tabela 3.3. Metabólitos identificados, por Cromatografia Líquida (LC-MS), durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* durante 144 horas após a inoculação, no modo positivo de operação (ESI⁺).

Tempo	Metabólito	ID de acesso ¹	Nome comum ²	Classe do metabólito ³
	605	HMDB0114813	<i>PA (15:0/14:1(9Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	503	HMDB0034339	<i>Ixocarpalactone B</i>	<i>Steroids and steroid derivatives</i>
	423	HMDB0032386	<i>2-Methylacetophenone</i>	<i>Fatty Acyls</i>
	299	HMDB0030202	<i>Fumigaclavine A</i>	<i>Ergoline and derivatives</i>
	321	HMDB0037321	<i>Oleacein</i>	<i>Phenols</i>
	589	HMDB0035103	<i>Lansioside C</i>	<i>Organoxygen compounds</i>
	645	HMDB0114946	<i>PA (18:2(9Z,12Z)/14:0)</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	387	HMDB0011147	<i>DG (O-18:0/2:0/0:0)</i>	<i>Glycerolipids</i>
0 h.a. i	514	HMDB0015584	<i>Maraviroc</i>	<i>Tropane alkaloids</i>
	461	HMDB0114747	<i>LysoPA (20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	666	HMDB0001487	<i>NADH</i>	<i>Fatty Acyls</i>
	768	HMDB0009259	<i>PE (20:1(11Z)/18:3(6Z,9Z,12Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	784	HMDB0010707	<i>CerP(d18:1/26:1(17Z))</i>	<i>Sphingolipids</i>
	619	HMDB0040379	<i>Simulanoquinoline</i>	<i>Benzophenanthridine alkaloids</i>
	711	HMDB0114827	<i>PA (15:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	736	HMDB0113909	<i>PE-NMe2(14:1(9Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
	564	HMDB0004948	<i>Ceramide (d18:1/9Z-18:1)</i>	<i>Sphingolipids</i>
	458	HMDB0006486	<i>5-Methyldihydrofolic acid</i>	<i>Pteridines and derivatives</i>
	802	HMDB0112689	<i>PS (20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>
144 h.a. i	601	HMDB0132797	<i>6-({2-[5-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-2,4-dihydroxyphenyl]</i>	<i>Flavonoids</i>
	287	HMDB0034012	<i>3,4-Dihydroxy-9-methoxypterocarpan</i>	<i>Isoflavonoids</i>
	383	HMDB0010343	<i>Ibuprofen glucuronide</i>	<i>Organoxygen compounds</i>
	747	HMDB0115357	<i>PA (22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:2(9Z,12Z))</i>	<i>Glycerophospholipids</i>

447	HMDB0013845	SR 49498	Benzene and substituted derivatives
986	HMDB0011120	<i>trans</i> -2-Enoyl-OPC4-CoA	Fatty Acyls
789	HMDB0115433	PA (24:0/18:0)	Glycerophospholipids
806	HMDB0113653	PE-NM e(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z) / 18:1(9Z))	Glycerophospholipids
811	HMDB0009778	PI (16:0/16:0)	Glycerophospholipids
922	HMDB0114699	PE-NM e2(13D5/11M5)	Glycerophospholipids
795	HMDB0116584	PG (20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/18:2(9Z,12Z))	Glycerophospholipids
740	HMDB0113028	PE-NM e (15:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	Glycerophospholipids
790	HMDB0011288	PC(P-18:1(11Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	Glycerophospholipids
726	Desconhecido	--	--
966	HMDB0061577	PS (DiMe(13,5) / MonoMe (13,5))	Glycerophospholipids
792.1	HMDB0012378	PS (18:0/18:0)	Glycerophospholipids
619	HMDB0128188	6-{4-[5,7-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxybenzoyloxy)-3,4-dihydro	Flavonoids
608	Desconhecido	--	--
692	HMDB0112321	PS (15:0/14:1(9Z))	Glycerophospholipids
249	HMDB0036640	Furanofukinin	Prenol lipids
221	HMDB0040217	3,4-Dihydro-2,2,5,7,8-pentamethyl-2H-1-benzopyran-6-ol	Benzopyrans
694	Desconhecido	--	--
235	HMDB0034562	9-Pentadecene-12,14-diyne-1,11-diol	Fatty Acyls
475	HMDB0035144	(3beta,17alpha,23S,24S)-17,23-Epoxy-3,24,29-trihydroxy-27-norlanost-8-en-15-one	Prenol lipids
792	HMDB0008490	PC (20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/P-18:1(11Z))	Glycerophospholipids
736	HMDB0008847	PE (14:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	Glycerophospholipids
696	HMDB0009213	PE (18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-16:0)	Glycerophospholipids
932	HMDB0112734	PS (22:0/24:0)	Glycerophospholipids
822	HMDB0114365	PE-NM e2(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/20:1(11Z))	Glycerophospholipids
102	HMDB0029615	(S)-2-Azetidinecarboxylic acid	Carboxylic acids and derivatives

¹ ID de acesso é a identificação de acesso do metabólito no banco de dados do HMDB ([Human Metabolome Database \(hmdb.ca\)](http://Human Metabolome Database (hmdb.ca))).

² Nome do metabólito de acordo com o banco de dados do HMDB ([Human Metabolome Database \(hmdb.ca\)](http://Human Metabolome Database (hmdb.ca))).

³ Classe do metabólito de acordo com o banco de dados do HMDB ([Human Metabolome Database \(hmdb.ca\)](http://Human Metabolome Database (hmdb.ca))).

A partir da análise metabólica, de acordo com a Cromatografia Líquida (LC-MS) no modo negativo, às zero horas após a inoculação foram identificados metabólitos pertencentes à 4 classes distintas. Foi possível classificar um metabólito em cada uma das classes: Flavonóide, Isoquinolina de fitalida, desconhecido e Pirano (Figura 3.12A).

No estudo metabolômico da interação entre *A. psidii* e *E. grandis* realizado às 144 horas após a inoculação os metabólitos identificados pertenciam a apenas três classes: Benzeno e derivados substituídos (2 metabólitos), Isoquinolinas de fitalida (2 metabólitos) e desconhecido (1 metabólito) (Figura 3.12B).

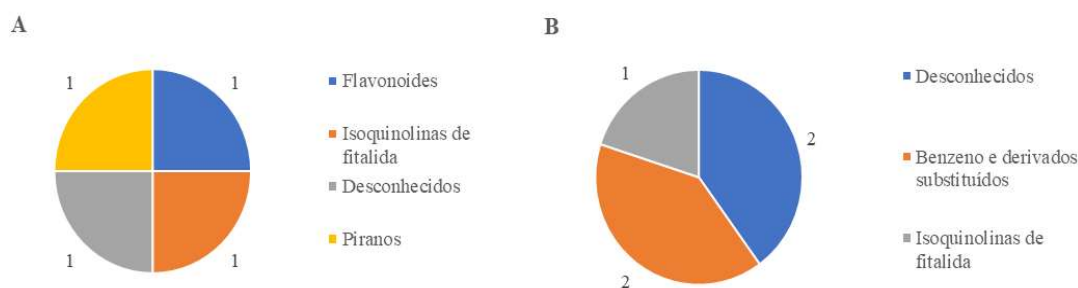


Figura 3.12. Classes de metabólitos identificados durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* na análise LC-MS Modo Negativo de Operação. A – Classes de metabólitos presentes às 0 h.a.i.. B – Classes de metabólitos presentes às 144 h.a.i.

A partir da análise metabolômica, por Cromatografia Líquida no modo negativo de operação, foram identificados 9 metabólitos durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* (de 0 às 144 h.a.i) (Tabela 3.4).

No tempo inicial (0 h.a.i) foram identificados 4 metabólitos, onde um não obteve similaridade com nenhum outro metabólito do banco de dados analisado. O flavonóide *6-Hydroxy-3,3',4',5,7,8-hexamethoxyflavone* pode ter função relacionado à defesa da planta contra o ataque de microrganismos causadores de doenças.

Às 144 h.a.i foram identificados 5 metabólitos, sendo que 3 deles não possuíram similaridade com nenhum metabólito presente no banco de dados analisado. Um metabólito encontrado e que pode ter uma função importante na interação planta-patógeno é a *Chlorhexidine*, importante agente antimicrobiano que pode estar auxiliando a planta no combate ao fungo nesta etapa do processo de infecção.

Tabela 3.4. Metabólitos identificados, por Cromatografia Líquida (LC-MS), durante o processo de infecção de *A. psidii* em *E. grandis* entre zero e 144 horas após a inoculação, no modo negativo de operação (ESI).

Tempo	Metabólito	ID de acesso ¹	Nome comum ²	Classe ³
0 h.a. i	417	HMDB0041359	<i>6-Hydroxy-3,3',4',5,7,8-hexamethoxyflavone</i>	<i>Flavonoids</i>
	499	HMDB0240249	<i>Tritoqualine</i>	<i>Phthalide isoquinolines</i>
	635	Desconhecido	--	--
144 h.a. i	415	HMDB0030522	<i>Citreoviridin D</i>	<i>Pyrans</i>
	787	Desconhecido	--	--
	529	Desconhecido	--	--
	551	HMDB0034585	<i>Schizotenuin F</i>	<i>Benzene and substituted derivatives</i>
	503	HMDB0015016	<i>Chlorhexidine</i>	<i>Benzene and substituted derivatives</i>
	499	HMDB0240249	<i>Tritoqualine</i>	<i>Phthalide isoquinolines</i>

¹ ID de acesso é a identificação de acesso do metabólito no banco de dados do HMDB (Human Metabolome Database (hmdb.ca)).

² Nome do metabólito de acordo com o banco de dados do HMDB (Human Metabolome Database (hmdb.ca)).

³ Classe do metabólito de acordo com o banco de dados do HMDB (Human Metabolome Database (hmdb.ca))

Análise de metabólitos totais de plantas de *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* – GC-MS

Em relação aos metabólitos provenientes da análise de GC-MS, a separação dos grupos por tratamentos indica que a ação do fungo altera o perfil metabólico das plantas de eucalipto. Esta separação de grupos pôde ser observada pela análise PLS-DA, não havendo diferença significativa entre as amostras pertencentes ao mesmo tratamento, com um $R^2= 0,99$ e um $Q^2= 0,95$ (Figura 3.13).

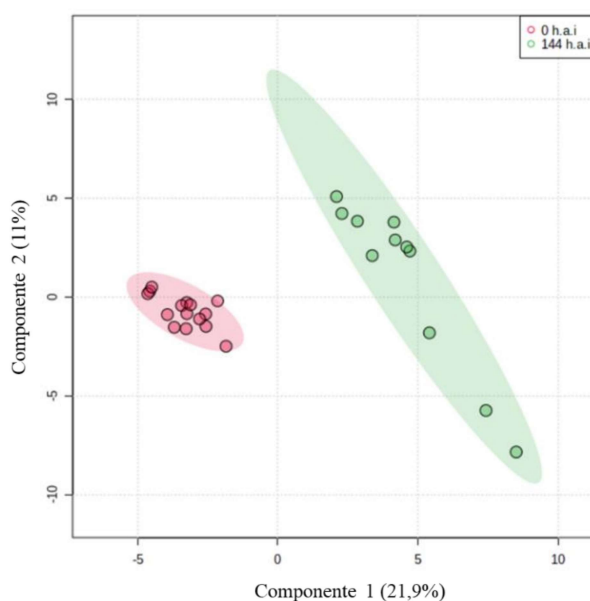


Figura 3.13. *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) proveniente de LC-MS. Separação das amostras entre grupos distintos, relacionados aos metabólitos totais identificados da interação *E. grandis* x *A. psidii* (MF-01) nos tempos: 0 h.a.i e 144 h.a.i. $R^2= 0,99$; $Q^2= 0,94$. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst.

Dos 207 possíveis metabólitos identificados nas análises de GC-MS, apenas 32 foram que mais contribuíram para as diferenças de abundância após a análise de VIPs. (Figura 3.14).

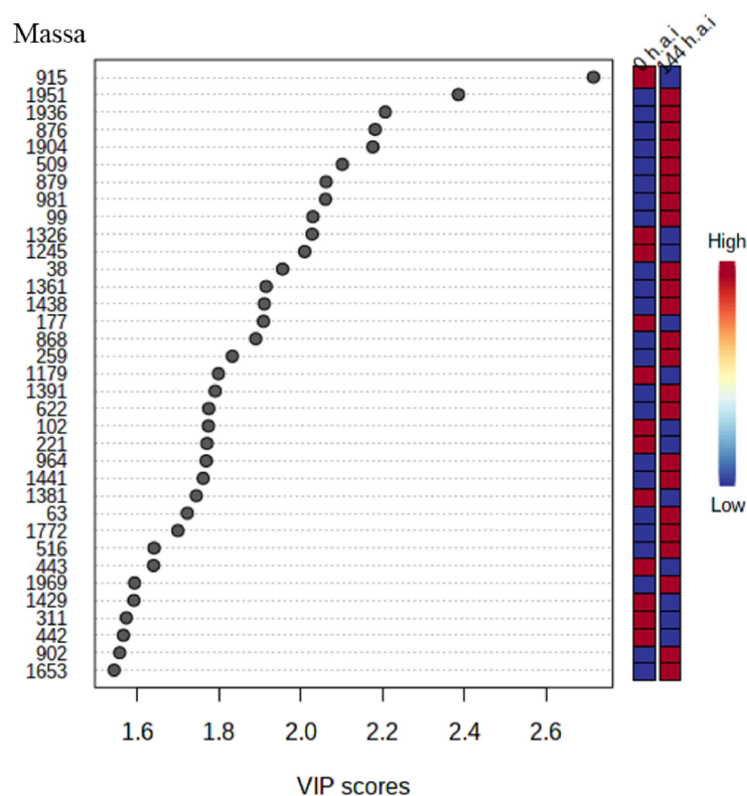


Figura 3.14. Importância das variáveis nas projeções multivariadas (VIPs) com score $\geq 1,5$ provenientes do estudo de GC-MS do metaboloma de plantas de *Eucalyptus grandis* zero horas e 144 horas após a inoculação com *Austropuccinia psidii*. O gráfico foi gerado pelo programa Metaboanalyst. A diferença na coloração indica se a proteína se encontra em maior ou menor abundância no tratamento. Azul – menor abundância; Beje – abundância média; Vermelho – maior abundância.

Em relação aos 32 metabólitos (GC-MS) que mais contribuíram para as diferenças de abundância após análises VIP, foi observado que 7 estavam presentes às zero horas após a inoculação, 24 às 144 horas após a inoculação e 1 estava presente em ambos os tempos (Tabela 3.5).

Dos metabólitos encontrados às 0 h.a.i, 4 não possuíam similaridade com o banco de dados de metabólitos do equipamento analisado. O ácido cinâmico é um importante metabólito encontrado nesta fase inicial de infecção do fungo, estando associado com a entrada do patógeno na planta.

No estudo metabolômico realizado às 144 h.a.i, dos 24 metabólitos identificados, 7 não possuíam similaridade com o banco de dados do equipamento analisado, permanecendo desconhecidos. Os metabólitos Calistegina A3, ácido azelaico, ácido glicérico-3-fosfato e piridoxamina são compostos importantes durante a interação planta-patógeno, estando relacionados com ações de defesa da planta contra o ataque de *A. psidii* (MF-01).

Tabela 3.5. Metabólitos identificados a partir da inoculação de *A. psidii* em plantas de *E. grandis* e analisados por GC-MS durante o processo de infecção (0 à 144 horas após a inoculação).

Tratamento	Código	Nome do metabólito
0 h.a.i	915	Galactose
	1381	Desconhecido
	1179	Adenina
	1326	Desconhecido
	1245	Ácido cinâmico
	177	Desconhecido
	1993	NA272011
144 h.a.i	509	Ácido glutâmico-N-Metil
	1904	Desconhecido
	1936	Desconhecido
	876	Octopamina
	1361	Octopamina
	868	Calistegina A3
	1951	Desconhecido
	1969	D270080
	516	Ácido butanóico-4-amino
	1438	Piridoxamina
	902	Desconhecido
	99	Ácido succinico-Metilester
	981	Galactopiranosido-1-O-metil-alfa
	38	Desconhecido
	1622	Amida de ácido palmítico
	960	Ácido glicérico-3-fosfato
	813	Desconhecido
1799	Uridina	
964	Ácido azelaico	

	259	similar a Lumicromo
	1772	Ácido glucônico-6-fosfato
	1391	Ácido hexadecanóico
	622	Desconhecido
	63	Butiro-1,4-lactama
0 h.a.i/144 h.a.i	879	NA_220_205_95

DISCUSSÃO

A interação planta-patógeno é baseada no reconhecimento mútuo. Além disso, essa interação depende da expressão de fatores de patogenicidade e virulência do fungo, enquanto na planta, depende da existência de mecanismos de defesa pré-formados ou defesa induzida (González-Fernández; Prats; Jorrín-Novo, 2010). Um grande número de mecanismos e moléculas fúngicas têm demonstrado contribuir para a patogenicidade ou virulência dos fungos, incluindo proteínas que degradam a parede celular (Kikot; Hours; Alconada, 2009), proteínas inibitórias (Van Esse et al., 2008), e enzimas envolvidos na síntese de toxinas (Lawrence et al., 2008).

Durante o estudo proteômico da interação entre *A. psidii* MF-01 e *E. grandis*, foram identificadas no total 2.299 proteínas. Destas, 2.156 (404 exclusivas e 692 comuns – 0 h.a.i) e (368 exclusivas e 692 comuns – 144 h.a.i) foram associadas a plantas de eucalipto, e 143 (40 exclusivas e 44 comuns – 0 h.a.i) e (59 exclusivas e 44 comuns – 144 h.a.i) relacionadas ao fungo. A partir da análise proteômica realizada durante a interação (36, 60, 72, 84 e 96 h.a.i) entre *Colletotrichum lupini* e *Lupinus polyphylus*, foi possível identificar um total de 304 proteínas quantificadas por Eksigent nlc425 nanoHPLC (SCIEX) acoplado à um espectrômetro de massa Q exactive+ (Dubrulle et al., 2020). Mostrando que em relação às proteínas totais, o presente trabalho apresentou um número bem superior de proteínas identificadas.

A interação entre planta e patógeno durante a infecção é um campo de batalha no qual o patógeno ataca e a planta ativa os mecanismos de defesa (Maor; Shirasu, 2005). Dentre os mecanismos de ataque utilizados por *A. psidii* MF-01 durante o processo de infecção em *E. grandis*, algumas proteínas foram identificadas como diretamente associadas à patogenicidade, merecendo destaques: *Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein* (0 h.a.i); *transaldolase* (144 h.a.i) e *adenosylhomocysteinase* (144 h.a.i).

A proteína *Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein* desempenha um papel fundamental na regulação da infecção de plantas, devido ao seu papel no controle da polaridade. Também está associado a um mecanismo que atua, por meio da síntese regulada de espécies reativas de oxigênio e controle do complexo NADPH oxidase, na montagem da septina que faz parte da F-actina, que serve como base para a formação do apressório (Galhano et al., 2017). Galhano et al. (2017) identificaram a Tpc1 (Fator de transcrição para o controle de polaridade 1), que regula o crescimento polarizado invasivo de *Magnaporthe oryzae* na doença conhecida como brusone do arroz, e descobriram que Tpc1 participa diretamente da via Pmk1 e é necessária para autofagia associada à infecção, que são pré-requisitos essenciais para a formação e função de apressório. *Fungal Zn binuclear cluster domain containing protein* interessante foi identificada às 0 h.a.i no proteoma do fungo *A. psidii* em *E. grandis*, esta proteína identificada em MF-01, pode estar associada à uma importante função nos estágios iniciais do processo de infecção do patógeno, atuando na formação do apressório.

A proteína *transaldolase* desempenha um papel fundamental em diversas atividades vitais, como no desenvolvimento e metabolismo de fungos fitopatogênicos. A *transaldolase* é regulada positivamente no micélio de *Magnaporthe oryzae* sob condições de estresse por falta de nitrogênio, sugerindo que em *M. oryzae* a proteína auxilia nas vias do metabolismo de nutrientes e na patogenicidade, como também regulando reações específicas de metabolismo da glicose durante a privação de nitrogênio (Zhou et al., 2016). Esta mesma proteína pode estar desempenhando essas funções durante a interação de MF-01 em plantas de *E. grandis*, participando nas vias do metabolismo e na patogenicidade do fungo às 144 h.a.i.

Nogueira-Lopez et al. (2018) investigaram a colonização de raízes de milho por *Trichoderma virens* em condições hidropônicas por 5 dias, evidenciando a colonização inter e intracelular pelo fungo, que resultaram em modificações na morfologia da raiz. Aliado a um estudo proteômico mostraram que após a penetração do hospedeiro, *T. virens* secreta no apoplasto, um arsenal de proteínas para facilitar a colonização. Foram identificadas proteínas envolvidas na sinalização de fitohormônios, Estes eram predominantemente da via do etileno, incluindo proteínas responsáveis pela biossíntese do precursor componentes como a *adenosylhomocysteinase*. Esta proteína, também identificada no presente trabalho (144 h.a.i) pode estar auxiliando o patógeno MF-01 na colonização dos tecidos da folha de *E. grandis* durante o período de infecção. Isso sugere que essa proteína desempenha importante papel tanto na interação entre fungo benéfico como fitopatogênicos e seus respectivos hospedeiros.

Em relação ao proteoma da planta, dependendo do tempo e do tratamento em que as proteínas foram identificadas, estavam associadas a funções distintas. Neste sentido, foram

identificadas diversas proteínas associadas à *E. grandis* inoculadas com *A. psidii* que merecem destaque nesta interação: *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* e *rubisco accumulation factor 1* identificadas às 0 h.a.i e as proteínas *malate dehydrogenase*, *major allergen Pru av 1-like*, *abscisic stress ripening protein*, *actin-7*, *V-type proton ATPase*, *proteasome subunit alpha* e *isoflavone reductase-like* identificadas às 144 h.a.i.

A fotossíntese é certamente um dos processos biológicos mais importante da Terra, que compreende reações para a conversão de energia solar em energia química para a produção final de ATP para as plantas (Öquist; Huner, 2003). Uma etapa final de limitação da taxa fotossintética é catalisada por uma enzima naturalmente ineficiente para a fixação de carbono, a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (rubisco) (Bracher et al., 2017). A chaperona *rubisco accumulation factor 1* (Raf1) é uma proteína que facilita a montagem da Rubisco. É evolutivamente conservada, e sua importância nas plantas e cianobactérias permanecem controversas (Huang et al., 2020). No milho, a deleção genética de *raf1* resultou na depleção de rubisco e morte da planta (Feiz et al., 2012), também em milho a superexpressão de subunidades de rubisco em combinação com Raf1 pode aumentar o conteúdo de proteína Rubisco e sua atividade (Salesse-Smith et al., 2018). As proteínas *ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase* e *rubisco accumulation factor 1* também foram encontradas neste estudo durante a interação planta-patógeno (0 h.a.i). A rubisco é uma importante enzima no processo de fotossíntese e a *rubisco accumulation factor 1* pode ter sua função associada à Rubisco, durante o processo de obtenção de energia para o metabolismo da planta. A identificação desse tipo de proteína no estágio inicial (0 h.a.i) da interação de *E. grandis* com o fungo já era esperado, já que são proteínas comumente encontradas em vegetais.

Em relação aos processos de defesa, o suprimento de energia da planta é redistribuído no sentido de reconhecimento de patógenos e sinalização de defesa de plantas (Bolton et al., 2009). Assim, algumas proteínas relacionadas à defesa da planta em detrimento do ataque do fungo MF-01 foram identificadas.

A proteína *malate dehydrogenase* está envolvida na via metabólica do malato, e associada a várias outras enzimas que possuem importantes funções associadas à proteção e reparação de plantas contra o estresse biótico e abiótico (Casati et al., 1999). Geddes et al. (2008) inoculou o patógeno *Fusarium graminearum* em plantas de *Hordeum vulgare*, e a partir de um estudo proteômico, identificou dentre outras proteínas, a proteína *malate dehydrogenase*. Observaram que a grande realocação de *malate dehydrogenase* ao citosol estava associada ao aumento da resposta da planta ao estresse oxidativo. Tal como uma explosão oxidativa massiva auxiliando a defesa da planta contra os radicais livres de oxigênio, concluindo que a *malate*

dehydrogenase pode ter ação oxidativa direta sobre *F. graminearum*. No presente trabalho, a *malate dehydrogenase* foi identificada às 144 h.a.i, podendo também estar relacionada ao combate à *A. psidii* a partir de uma ação oxidativa sobre o fungo.

As glicolinas em geral protegem os tecidos das plantas dos desafios ambientais, possivelmente reduzindo o dano oxidativo induzido por fatores de estresses, possuindo propriedades antioxidantes celulares consideráveis (Nwachukwu; Luciano; Udenigwe, 2013). A *isoflavone reductase-like protein* (IFR) é iclassificada como uma enzima crucial envolvida na síntese das glicolinas (Yu et al., 2003). Este composto também se acumula em resposta ao ataque de patógenos, elicitores fúngicos e aos estresses biótico e abiótico (Kim et al., 2003). A *isoflavone reductase-like protein*, encontrada às 144 h.a.i de *A. psidii* em plantas de *E. grandis*, pode funcionar como uma enzima sinalizadora sobre a presença do patógeno e seu combate.

Semelhantemente a outras proteínas encontradas neste trabalho, Yan et al. (2018) a partir de um estudo proteômico durante a interação entre a levedura *Meyerozyma guilliermondii* e frutas de *Pyrus pyrifolia*, identificaram as proteínas: *major allergen Pru av 1-like*, *abscisic stress ripening protein*, *actin-7*, *V-type proton ATPase* e *proteasome subunit alpha*. Indicando que a maioria das proteínas está envolvida em respostas de defesa e estresse com base em processos biológicos.

Os sistemas biológicos em um organismo são frequentemente representados como redes que consistem em interações complexas entre elementos biológicos, como genes, proteínas e metabólitos. Essas redes moleculares fornecem ao organismo uma variedade de funções regulatórias (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Em um contexto ecológico, os organismos não vivem isolados, mas com interações íntimas com outros organismos. Durante o curso da coevolução com as plantas hospedeiras, os patógenos desenvolveram diversos mecanismos de virulência para manipular componentes das redes imunológicas das plantas (Toruño; Stergiopoulos; Coaker, 2016). Na última década, um progresso significativo foi feito na análise de sistemas de redes moleculares subjacentes às interações planta-patógeno, mas com foco principal no lado da planta durante as interações (Mine; Sato; Tsuda, 2014; Peyraud et al., 2017). No entanto objetivo deste trabalho é dar uma maior atenção ao patógeno.

Foi possível observar neste estudo que há uma correlação entre as proteínas XP_010028896.1 (*eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3*), XP_010056880.1 (*urease accessory protein G*), XP_010062321.1 (*expansin-A13*), XP_010066331.1 (*ubiquitin domain-containing protein DSK2a isoform X1*), XP_010044210.1 (*phosphoglucomutase cytoplasmic isoform X2*), XP_010038186.1 (*glutathione S-transferase F13*) identificadas em *E.*

grandis com a proteína evm.model.NODE_10888_length_9735_cov_3.75075.1 (*ADP-ribosylation factor*) encontrada no estudo proteômico em *A. psidii*.

A proteína *ADP-ribosylation factor* pertencente à família Arf participa do crescimento e desenvolvimento das hifas através da secreção de um composto importante no transporte de vesículas (Lee; Shaw, 2008; Harris, 2013). Este papel possui uma função associada com o transporte de vesículas associadas a reguladores do Complexo de Golgi, incluindo complexo COG (*Conserved Oligomeric Golgi*) e complexo TRAPP II (*Transport Protein Particle complexes*) (Gremillion et al., 2014; Pinar et al., 2019). Wang et al. (2020) realizaram um estudo *in vitro* e *in planta* observando o crescimento de hifas de *F. graminearum* e patogenicidade em plantas de trigo suscetíveis. Realizaram a deleção do gene FgARL1 associado à proteína *ADP-ribosylation factor*, o que resultou em uma diminuição significativa no crescimento vegetativo e patogenicidade do fungo. Esse resultado indica que FgAr11 é importante no desenvolvimento e patogenicidade de *F. graminearum*. Neste sentido, a *ADP-ribosylation factor*, identificada como a proteína central na correlação entre proteínas de *A. psidii* e *E. grandis*, pode realmente estar relacionada com o crescimento vegetativo do fungo e no potencial patogênico durante a interação planta- patógeno.

Em contrapartida, as proteínas identificadas em *E. grandis* estão relacionadas à defesa da planta devido ao ataque de *A. psidii*. A proteína *urease accessory protein G* está associada à respostas a estresses (Emamverdian et al., 2015); *glutathione S-transferase F13* participa na indução de resistência sistêmica devido a ataque de patógenos em plantas (Gullner et al., 2018); a *expansin-A13* está presente durante a interação planta-patógeno, atuando na detecção de proteínas por receptores específicos da célula hospedeira; regulando alterações nas propriedades de barreira da parede celular detectadas pelo hospedeiro e auxiliando no deslocamento de polissacarídeos da parede celular detectados pelo hospedeiro (Narváez-Barragán et al., 2020). Ficando nítido que o sistema defensivo da planta está agindo para combater o fungo durante o desenvolvimento da doença.

As infecções por patógenos levam as plantas a ativar seu sistema de defesa, permitindo que elas reconheçam ataques e iniciem o combate ao organismo invasor, resultando em alterações físicas e bioquímicas, bem como na produção de metabólitos (Zaynab et al, 2018; Zaynab et al, 2019; Panda et al, 2019). Entre as primeiras respostas das plantas às infecções fúngicas estão as explosões oxidativas (Sun et al, 2016) e a resposta hipersensível (Kliebenstein et al, 2008; Markiewicz et al, 2019), que causa estresse oxidativo, o mais forte processo de resistência a doenças (Baba et al, 2015; Prash et al, 2015).

No presente trabalho foram identificados, incluindo todos os tempo avaliados, vários metabólitos, sendo 59 (50 no modo positivo de operação; 16 às 0 h.a.i e 34 às 144 h.a.i e 9 no modo negativo de operação; 4 às 0 h.a.i e 5 às 144 h.a.i) provenientes da interação planta-patógeno baseado na análise de Cromatografia Líquida (LC-MS) e 32 (com 7 às 0 h.a.i; 24 às 144 h.a.i e 1 presente em ambos os tempos analisados) a partir da análise de Cromatografia Gasosa (GC-MS).

O composto fenólico predominante na pasta triturada e no azeite de oliva virgem, obtido do triturado de azeitonas (*Olea europaea*), é a *oleacein*. A alta concentração de *oleacein* no azeite ocorre devido à hidrólise da oleuropeína catalisada por glicosidases endógenas durante o esmagamento da azeitona (Le Tutour; Guedon, 1992; Vierhuis et al., 2001). Diversos estudos indicam que a *oleacein* possui propriedades importantes para o auxílio na manutenção da saúde e combate a doenças em humanos (Lombardo et al., 2018; Juli et al., 2019; Carpi et al., 2020). Bini (2016), realizou um ensaio de germinação de urediniósporos de *A. psidii in vitro* em diferentes condições. Dentre os tratamentos propostos (meio de cultura ágar-água (AA); AA + óleo de oliva 0,5% e AA + azeite de oliva 0,5%), observou que o tratamento adicionado de azeite de oliva 0,5% elevou a taxa de germinação dos urediniósporos em 40% em relação ao tratamento com óleo mineral 0,5%. Neste sentido, na interação planta-patógeno, a *oleocin*, encontrado às 0 h.a.i no estudo metabólico (LC-MS; modo positivo de operação) deste trabalho, pode ser um composto chave presente em folhas de *E. grandis*, associado a germinação de *A. psidii* em plantas suscetíveis do eucalipto.

Ceramides são moléculas fundamentais, atuando como intermediários na biossíntese e catabolismo de esfingolipídios, que agem como precursores no metabolismo de esfingolipídios (Hannun; Obeid, 2008). A *ceramide* é também considerada uma molécula de sinalização chave, envolvida na oxidação intracelular na via de estresse, e está associada a muitos processos fisiopatológicos (Czubowicz et al., 2019). Nas plantas, uma conexão entre esfingolipídeos, patógenos de plantas e morte celular programada foi descoberta após o tratamento de plantas com micotoxinas análogas da esfinganina que são sintetizadas pelos fungos patogênicos *Fusarium moniliforme* e *Alternaria alternata* (Abbas et al., 1994). Neste sentido, alguns estudos sugerem que a *ceramide* está associada à defesa de plantas contra o ataque de patógenos (Sperling; Heinz, 2003; Pata; Hannun; Ng, 2010). No presente trabalho, a partir do estudo de metabólitos (LC-MS; modo positivo de operação), às 144 h.a.i da inoculação de MF-01 em *E. grandis*, o metabólito *ceramide* foi identificado. Este, portanto, pode estar desempenhando alguma função de defesa da planta contra o ataque do fungo.

Flavonóides polimetoxilados (PMFs), estão presentes em frutas cítricas em uma variedade de estruturas químicas e com muitos potenciais propriedades benéficas, como antiinflamatório, antitumoral, e atividades de proteção cardiovascular (Benavente-Garcia; Castillo, 2008). O flavonóide. O flavonóide *6-Hydroxy-3,3',4',5,7,8-hexamethoxyflavone* foi identificado em folhas de *E. grandis* inoculadas com MF-01 (0 h.a.i; modo negativo de operação), podendo ser a primeira vez que este flavonóide é encontrado em uma planta diferente das cítricas, podendo ter uma função associada ao sistema de defesa da planta contra o ataque do patógeno.

A *Chlorhexidine* é um agente antimicrobiano que é amplamente utilizado em uma variedade de produtos anti-sépticos, desde produtos para a pele, sabonetes, enxaguantes bucais, desinfetantes e conservantes (McDonnells; Russell, 1999; Russel, 2010). A *Chlorhexidine* é muito eficaz contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas, mas também tem atividade contra bactérias gram-negativas e fungos e pode ser usado com uma variedade de antibióticos comuns (Kampf; Kramer, 2004). Este mesmo metabólito foi encontrado neste estudo, a partir da análise metabólica (144 h.a.i; modo negativo de operação), e provavelmente está relacionado como substância produzida pelo sistema defensivo de *E. grandis* contra o ataque de *A. psidii* (GM-J1).

A partir do estudo metabolômico (GC-MS) realizado durante o processo infeccioso de *A. psidii* em *E. grandis* foi possível identificar um metabólito que pode ser importante na fase inicial do processo de infecção (0 h.a.i) de *A. psidii* em plantas de *E. grandis* é o ácido cinâmico. Estudos indicam que a presença deste composto alelopático em determinadas concentrações auxilia na entrada do patógeno, por interferir no vazamento de íons da planta, acarretando na permeabilidade da membrana plasmática (Yu e Matsui, 1994; Yu e Matsui, 1997).

Todos os metabólitos encontrados às 144 h.a.i. estão atuando no combate ao fungo., com destaque aos metabólitos: Calistegina A3, ácido azelaico, ácido glicérico e piridoxamina.

A calistegina A3, por exemplo, é um metabólito classificado como um alcaloide, comumente encontrado em folhas de plantas (Czuk et al, 2008). É sabidamente um forte antioxidante e anti-inflamatório que auxilia no controle de doenças em humanos (Chacko et al, 2011; Buapool et al, 2013), e que pode estar auxiliando a planta a combater o fungo às 144 h.a.i.

O ácido azelaico é um ácido dicarboxílico e uma substância sinal do estresse oxidativo que está envolvido na resistência adquirida sistêmica, resultante da liberação de gorduras insaturadas livres causada pela infecção de patógenos (Zoeller et al, 2012; Yu et al, 2013).

A presença do ácido glicérico pode estar relacionada à ocorrência da fotorrespiração. A via da fotorrespiração é usada para evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), dissipando excesso de equivalentes redutores e energia, como a regeneração do ADP e do consumo de ATP para converter o ácido glicericídico em ácido fosfoglicerílico (Voss et al., 2013). Pode também regular a defesa das plantas ao estresse biótico (Kangasjärvi et al., 2012), como o ataque do fungo à planta.

A piridoxamina é um metabólito associado à vitamina B6, acredita-se que funcione como um antioxidante porque está positivamente correlacionado com a resposta ao estresse oxidativo em animais e plantas (Hellmann e Mooney, 2010).

Desta maneira pode-se inferir que a inoculação de *A. psidii* em plantas de *E. grandis* contribuiu enormemente para a mudança no perfil proteico e do metabolismo de ambos os organismos envolvidos, identificando compostos sendo produzidos desde os estágios iniciais (0 h.a.i) até o estágio mais avançado da doença (144 h.a.i), com o patógeno usando de mecanismos para atacar a planta enquanto a planta se defendia do ataque.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Hamed K. et al. Fumonisin-and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. **Plant Physiology**, v. 106, n. 3, p. 1085-1093, 1994.
- AKARACHANTACHOTE, Noppamas; CHADCHAM, Seree; SAITHANU, Kidakan. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v. 94, n. 3, p. 307-322, 2014.
- ALFENAS, A. C. et al. Clonagem e Doenças do Eucalipto. 1ª Edição. **Viçosa MG. Editora UFV**. 442p, 2004.
- ALFENAS, A. C. et al. Clonagem e doenças do eucalipto. 2a. Edição. (Editora UFV: Viçosa, MG, Brazil), 2009.
- ALI, Kashif et al. Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. **Plant science**, v. 191, p. 100-107, 2012.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVARES, C. A. et al. Climatic favourability zones for Eucalyptus rust in Brazil. **Forest Pathology**, v. 47, n. 1, p. e12301, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PAPEL E CELULOSE. Disponível em: <http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/136>. Acesso em: 10 set. 2019.
- BABA, Shoib Ahmad et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. **South African Journal of Botany**, v. 99, p. 80-87, 2015.
- BALDWIN, M. A. Modern mass spectrometry in bioorganic analysis. **Natural Product Reports**, v. 12, n. 1, p. 33-44, 1995.
- BARROS, Bruno HR et al. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal biology**, v. 114, n. 7, p. 572-579, 2010.
- BECKER, Loïc et al. Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray–Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 795, p. 44-51, 2013.
- BEENKEN, Ludwig et al. Austropuccinia: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). **Phytotaxa**, v. 297, n. 1, p. 53-61, 2017.

- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.
- BENNETT, Richard N.; WALLSGROVE, Roger M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BINDSCHEDLER, Laurence V.; PANSTRUGA, Ralph; SPANU, Pietro D. Mildew-omics: how global analyses aid the understanding of life and evolution of powdery mildews. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 123, 2016.
- BRACHER, Andreas et al. Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco. **Annual review of plant biology**, v. 68, p. 29-60, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, 1976.
- BUAPOOL, Doungnapa et al. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 495-504, 2013.
- CAMBIAGHI, Alice; FERRARIO, Manuela; MASSEROLI, Marco. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Briefings in bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 498-510, 2017.
- CANDIANO, Giovanni et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.
- CARNEGIE, Angus J.; LIDBETTER, Jonathan R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 13-29, 2012.
- CARNEGIE, Angus J. et al. Impact of the invasive rust *Puccinia psidii* (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia. **Biological Invasions**, v. 18, n. 1, p. 127-144, 2016.
- CARNEGIE, Angus J.; PEGG, Geoff S. Lessons from the incursion of myrtle rust in Australia. **Annual review of Phytopathology**, v. 56, p. 457-478, 2018.
- CARPI, Sara et al. MiRNA modulation and antitumor activity by the extra-virgin olive oil polyphenol oleacein in human melanoma cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 1490, 2020.
- CASATI, Paula et al. Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. **Photosynthesis Research**, v. 61, n. 2, p. 99-105, 1999.
- CHACKO, Balu K. et al. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38738-38747, 2011.
- CHITTEM, Kishore et al. Transcriptome analysis of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* interaction with resistant and susceptible canola (*Brassica napus*) lines. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229844, 2020.
- CONESA, Ana et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- COUTINHO T. A. et al. *Eucalyptus* rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.
- CSUK, Rene; PRELL, Erik; REIßMANN, Stefan. Total synthesis of calystegine A7. **Tetrahedron**, v. 64, n. 40, p. 9417-9422, 2008.
- CZUBOWICZ, Kinga et al. The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 8, p. 5436-5455, 2019.
- DIXON, Richard A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843, 2001.
- DROSTE, Peter et al. Visualizing multi-omics data in metabolic networks with the software Omix—a case study. **Biosystems**, v. 105, n. 2, p. 154-161, 2011.
- DU PLESSIS, E., et al. The pandemic strain of *Austropuccinia psidii* causes myrtle rust in New Zealand and Singapore. **Australasian Plant Pathology**, 48(3), 253-256, 2019.
- DUBRULLE, Guillaume et al. Deciphering the Infectious Process of *Colletotrichum lupini* in Lupin through Transcriptomic and Proteomic Analysis. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1621, 2020.
- EMAMVERDIAN, Abolghassem et al. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- ESPINDOLA, F. S. et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.
- FEIZ, Leila et al. Ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize. **The Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3435-3446, 2012.
- FERREIRA, F. A. Ferrugem do eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 7, n. 2, p. 91-109, 1983.
- GALHANO, Rita et al. Tpc1 is an important Zn (II) 2Cys6 transcriptional regulator required for polarized growth and virulence in the rice blast fungus. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006516, 2017.
- GEDDES, Jennifer et al. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*. **Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 545-554, 2008.

- GIBLIN, F.; CARNEGIE, A. *Puccinia psidii* (Myrtle rust)-Australian and Global host lists. 2014.
- GLEN, M. et al. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy—a review. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, Raquel; JORRIN-NOVO, Jesus V. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 3-16, 2012.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel; PRATS, Elena; JORRÍN-NOVO, Jesús V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel et al. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. **Journal of proteomics**, v. 97, p. 195-221, 2014.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Victoria E. et al. Proteomic profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination. **Archives of microbiology**, v. 197, n. 2, p. 117-133, 2015.
- GOMEZ-CABRERO, David et al. Data integration in the era of omics: current and future challenges. 2014.
- GREMILLION, S. K. et al. Mutations in proteins of the Conserved Oligomeric Golgi Complex affect polarity, cell wall structure, and glycosylation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 69-82, 2014.
- GULLNER, Gábor et al. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1836, 2018.
- HARRIS, Steven D. Golgi organization and the apical extension of fungal hyphae: an essential relationship. **Molecular microbiology**, v. 89, n. 2, p. 212-215, 2013.
- HELLMANN, Hanjo; MOONEY, Sutton. Vitamin B6: a molecule for human health? **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 442-459, 2010.
- HOPFGARTNER, Gérard; VARESIO, Emmanuel. The life sciences mass spectrometry research unit. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 335-338, 2012.
- HUANG, Fang et al. Rubisco accumulation factor 1 (Raf1) plays essential roles in mediating Rubisco assembly and carboxysome biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 29, p. 17418-17428, 2020.
- HURKMAN, William J.; TANAKA, Charlene K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em 16 set de 2020.
- JULI, Giada et al. Anti-tumor Activity and Epigenetic Impact of the Polyphenol Oleacein in Multiple Myeloma. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 990, 2019.
- JUNGHANS, D. T. et al. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 1, p. 175-180, 2003.
- KAMPF, Günter; KRAMER, Axel. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 863-893, 2004.
- KANGASJÄRVI, Saijaliisa et al. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1619-1636, 2012.
- KIKOT, Gisele Eleonora; HOURS, Roque Alberto; ALCONADA, Teresa Maria. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. **Journal of basic microbiology**, v. 49, n. 3, p. 231-241, 2009.
- KIM, Sun Tae et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. **Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 2368-2378, 2003.
- KIM, Yonghyun; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, Mark R. Proteomics of filamentous fungi. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 395-400, 2007.
- KLIEBENSTEIN, Daniel J.; ROWE, Heather C. Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. **Plant Science**, v. 174, n. 6, p. 551-556, 2008.
- KOU, Mei-Chun et al. Effects of citrus flavonoids, 5-hydroxy-3, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxyflavone and 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone, on the activities of macrophage scavenger receptors and the hepatic LDL receptor. **Food & function**, v. 4, n. 4, p. 602-609, 2013.
- LAWRENCE, Christopher B. et al. At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. **Plant Pathol J**, v. 24, n. 2, p. 101-111, 2008.
- LE TUTOUR, Bernard; GUEDON, Didier. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1173-1178, 1992.
- LEE, Soo Chan; SHAW, Brian D. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. **FEMS microbiology letters**, v. 283, n. 2, p. 216-222, 2008.
- LEITE, Thiago Falda. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

- LÊ CAO, K.-A. A.; GONZÁLEZ, I.; DÉJEAN, S. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. **Bioinformatics**, v. 25, n. 21, p. 2855–2856, 1 nov. 2009.
- LIANG, Yue et al. Proteome changes in leaves of *Brassica napus* L. as a result of *Sclerotinia sclerotiorum* challenge. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1963-1976, 2008.
- LIANG, Yue et al. Developmentally induced changes in the sclerotial proteome of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 8, p. 619-627, 2010.
- LOMBARDO, Giovanni Enrico et al. Effects of oleacein on high-fat diet-dependent steatosis, weight gain, and insulin resistance in mice. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 116, 2018.
- LÓPEZ-GRESA, M. Pilar et al. Metabolic response of tomato leaves upon different plant–pathogen interactions. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 21, n. 1, p. 89-94, 2010.
- MAOR, Rudy; SHIRASU, Ken. The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 399-404, 2005.
- MARKIEWICZ, Monika; MICHALCZUK, Lech; NEUMÜLLER, Michael. Hypersensitive reaction of plum (*Prunus domestica*) in response to *Plum pox* virus infection: Changes in gene expression and identification of potential molecular markers. **Scientia horticulturae**, v. 247, p. 430-435, 2019.
- MASSON, Marcus Vinicius; MORAES, William Bucker; FURTADO, Edson Luiz. Chemical control of Eucalyptus rust: Brazilian experiences. **Fungicides-Showcases of integrated plant disease management from around the world**, p. 117-134, 2013.
- MAZID, M. et al. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and medicine**, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.
- MCDONNELL, Gerald; RUSSELL, A. Denver. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.
- MCTAGGART, Alistair R. et al. Rust (*Puccinia psidii*) recorded in Indonesia poses a threat to forests and forestry in South-East Asia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 83-89, 2016.
- MEHROTRA, B.; MENDES, P. Bioinformatics approaches to integrate metabolomics and other systems biology data. In: **Plant metabolomics**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 105-115.
- MINE, Akira; SATO, Masanao; TSUDA, Kenichi. Toward a system understanding of plant–microbe interactions. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 423, 2014.
- MORIN, Louise et al. Investigating the host-range of the rust fungus *Puccinia psidii* sensu lato across tribes of the family Myrtaceae present in Australia. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35434, 2012.
- MUCHERO, Wellington et al. Association mapping, transcriptomics, and transient expression identify candidate genes mediating plant–pathogen interactions in a tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 45, p. 11573-11578, 2018.
- MYBURG, Alexander A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356-362, 2014.
- NARVÁEZ-BARRAGÁN, Delia A. et al. Expansin-related proteins: biology, microbe–plant interactions and associated plant-defense responses. **Microbiology**, p. micro000984, 2020.
- NASCIMENTO, Rui et al. Early-stage metabolic events associated with the establishment of *Vitis vinifera*–*Plasmopara viticola* compatible interaction. **Plant physiology and biochemistry**, v. 137, p. 1-13, 2019.
- NOGUEIRA-LOPEZ, Guillermo et al. The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 409, 2018.
- NWACHUKWU, Ifeanyi D.; LUCIANO, Fernando B.; UDENIGWE, Chibuike C. The inducible soybean glyceollin phytoalexins with multifunctional health-promoting properties. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 1208-1216, 2013.
- ÖQUIST, Gunnar; HUNER, Norman PA. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 329-355, 2003.
- PANDA, Sayantan et al. *Piriformospora indica* primed transcriptional reprogramming induces defense response against early blight in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 255, p. 209-219, 2019.
- PANG, Qiuying et al. Metabolomics of early-stage plant cell–microbe interaction using stable isotope labeling. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 760, 2018.
- PATA, Mickael O.; HANNUN, Yusuf A.; NG, Carl K.-Y. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. **New Phytologist**, v. 185, n. 3, p. 611-630, 2010.
- PEGG, Geoff et al. Impact of *Austropuccinia psidii* (myrtle rust) on Myrtaceae-rich wet sclerophyll forests in south east Queensland. **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0188058, 2017.
- PEYRAUD, Rémi et al. Advances on plant–pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 720-737, 2017.
- PINAR, Mario et al. Characterization of *Aspergillus nidulans* TRAPPs uncovers unprecedented similarities between fungi and metazoans and reveals the modular assembly of TRAPPs. **PLoS genetics**, v. 15, n. 12, p. e1008557, 2019.

- PRASCH, Christian M.; SONNEWALD, Uwe. Signaling events in plants: stress factors in combination change the picture. **Environmental and Experimental Botany**, v. 114, p. 4-14, 2015.
- QUIRINO, B. F. et al. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 351-362, 2010.
- RAYACHHETRY, M. B. et al. Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. **Biological Control**, v. 22, n. 1, p. 38-45, 2001.
- RODRÍGUEZ-PIRES, Silvia et al. Proteomic Studies to Understand the Mechanisms of Peach Tissue Degradation by *Monilinia laxa*. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1286, 2020.
- ROUX, Jolanda et al. A unique genotype of the rust pathogen, *Puccinia psidii*, on Myrtaceae in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 645-652, 2016.
- RUSSELL, A. Denver. Microbial susceptibility and resistance to chemical and physical agents. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 2010.
- SALESSE-SMITH, Coralie E. et al. Overexpression of Rubisco subunits with RAF1 increases Rubisco content in maize. **Nature Plants**, v. 4, n. 10, p. 802-810, 2018.
- SANDHU, Karanjeet S.; PARK, Robert F. Genetic basis of pathogenicity in *Uredo rangelii*. **Final Report PHA_P218_4**, v. 1, p. 1-45, 2013.
- SANTOS, Isaneli Batista dos. **Deciphering the role of early molecular interactions between *Eucalyptus* spp. x *Austropuccinia psidii* and its pathogenesis**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019.
- SCHMIDT, T. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012.
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.
- SILVA, Renata Ruiz et al. Pre-infection stages of *Austropuccinia psidii* in the epidermis of *Eucalyptus* hybrid leaves with different resistance levels. **Forests**, v. 8, n. 10, p. 362, 2017.
- SPERLING, Petra; HEINZ, Ernst. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1632, n. 1-3, p. 1-15, 2003.
- SUN, Yingjiao; WANG, Yonglin; TIAN, Chengming. bZIP transcription factor CgAP1 is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fungal genetics and biology**, v. 95, p. 58-66, 2016.
- SUN, Huiying et al. Proteome of the fungus *Phoma macdonaldii*, the causal agent of black stem of sunflower. **Journal of Proteomics**, p. 103878, 2020.
- VAN ESSE, H. Peter et al. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. **The Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1948-1963, 2008.
- TAN, Kar-Chun et al. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 703-715, 2009.
- TATA, Alessandra et al. Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 4, p. 641-648, 2015.
- TIERI, Paolo et al. Integrating Omics data for signaling pathways, interactome reconstruction, and functional analysis. In: **Bioinformatics for Omics Data**. Humana Press, 2011. p. 415-433.
- TOMMERUP, I. C. et al. *Guava* rust in Brazil—a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 33, n. 3, p. 420-428, 2003.
- TORUÑO, Tania Y.; STERGIPOULOS, Ioannis; COAKER, Gitta. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 419-441, 2016.
- TRAPNELL, Cole; PACHTER, Lior; SALZBERG, Steven L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.
- UCHIDA, J.; ZHONG, S.; KILLGORE, E. First report of a rust disease on Ohia caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. **Plant Disease**, v. 90, n. 4, p. 524-524, 2006.
- VALVERDE, Sebastião Renato et al. O comportamento do mercado da madeira de eucalipto no Brasil. **Biomassa & Energia**, v. 1, n. 4, p. 393-403, 2004.
- VANDENKOORNHUYSE, Philippe et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196-1206, 2015.
- VIERHUIS, Esther et al. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1218-1223, 2001.
- VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008.
- VOSS, I. et al. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant biology**, v. 15, n. 4, p. 713-722, 2013.

- WALLACE, M. et al. Relationship between the lipidome, inflammatory markers and insulin resistance. **Molecular bioSystems**, v. 10, n. 6, p. 1586–95, 2014.
- WANG, Chenyu et al. The ADP-ribosylation factor-like small GTPase FgAr11 participates in growth, pathogenicity and DON production in *Fusarium graminearum*. **Fungal Biology**, v. 124, n. 11, p. 969-980, 2020.
- WANI, Zahoor Ahmed; ASHRAF, Nasheeman. Transcriptomic Studies Revealing Enigma of Plant-Pathogen Interaction. In: **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. Springer, Singapore, 2018. p. 219-238.
- WARTH, Benedikt et al. GC–MS based targeted metabolic profiling identifies changes in the wheat metabolome following deoxynivalenol treatment. **Metabolomics**, v. 11, n. 3, p. 722-738, 2015.
- WINGFIELD, M. J. et al. Planted forest health: the need for a global strategy. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 832-836, 2015.
- WINZER, Laura Fernandez et al. *Austropuccinia psidii* on the move: survey-based insights to its geographical distribution, host species, impacts and management in Australia. **Biological Invasions**, v. 21, n. 4, p. 1215-1225, 2019.
- WITTMANN-LIEBOLD, Brigitte; GRAACK, Hanns-Rüdiger; POHL, Thomas. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688-4703, 2006.
- WILKINS, Marc R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 61, 1996.
- XIAYAN, Li; LEGIDO-QUIGLEY, Cristina. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724-3736, 2008.
- YAN, Yuan et al. Control of postharvest blue mold decay in pears by *Meyerozyma guilliermondii* and it's effects on the protein expression profile of pears. **Postharvest biology and technology**, v. 136, p. 124-131, 2018.
- YU, Oliver et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 63, n. 7, p. 753-763, 2003.
- YU, Keshun et al. A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. **Cell Reports**, v. 3, n. 4, p. 1266-1278, 2013.
- ZAYNAB, Madiha et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.
- ZAYNAB, Madiha et al. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, p. 103728, 2019.
- ZHOU, X. G. et al. Proteomic analysis of mycelial proteins from *Magnaporthe oryzae* under nitrogen starvation. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 2, 2016.
- ZOELLER, Maria et al. Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 365-378, 2012.